

Aus dem Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich
(Direktion: Prof. Dr. H. U. Bertschinger)

Arbeit unter der Leitung von Dr. L. Corboz

PRAEVALENZ VON INFEKTIONEN MIT LEPTOSPIRA INTERROGANS BEIM HUND:

KULTURELLE UND SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

INAUGURAL - DISSERTATION

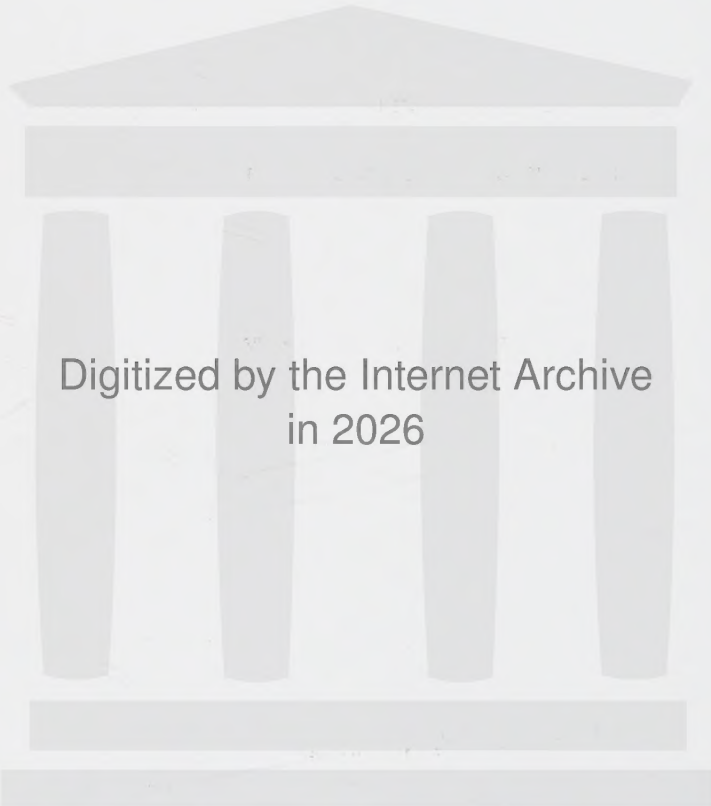
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär - Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Felix Rey, Tierarzt von Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. H. U. Bertschinger, Referent
Prof. Dr. P. E. Thomann, Korreferent

Zürich 1986

Rieker & Partner AG, Glattbrugg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507213_0022

Aus dem Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich
(Direktion: Prof. Dr. H. U. Bertschinger)

Arbeit unter der Leitung von Dr. L. Corboz

PRAEVALENZ VON INFEKTIONEN MIT LEPTOSPIRA INTERROGANS BEIM HUND:

KULTURELLE UND SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär - Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Felix Rey, Tierarzt von Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. H. U. Bertschinger, Referent
Prof. Dr. P. E. Thomann, Korreferent

Zürich 1986

Rieker & Partner AG, Glattbrugg

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. Einleitung und Literaturübersicht	7
1.1. Problemstellung	7
1.2. Historischer Ueberblick über die Leptospirose beim Hund	8
1.3. Bedeutung des Hundes als Infektionsquelle für den Menschen	9
1.4. Epidemiologische Untersuchungen über Leptospirose beim Hund im deutschsprachigen Raum	11
1.5. Diagnostik der Leptospirose	11
2. Material und Methoden	21
2.1. Untersuchungsgut	21
2.2. Untersuchung der Hunde auf Antikörper gegen Leptospiren	23
2.3. Nachweis von Leptospiren im Hundeharn	24
2.4. Weitere bakteriologische Untersuchung der Harnproben	29
3. Resultate	30
3.1. Häufigkeit von agglutinierenden Antikörpern gegen Leptospiren	30
3.2. Prävalenz der Leptospirurie	34
3.3. Methodische Aspekte und zusätzliche Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Leptospirennachweis aus Hundeharn	36
4. Diskussion	47
4.1. Serologische Untersuchung	47
4.2. Kultureller Nachweis von Leptospiren aus dem Harn	49
4.3. Gegenüberstellung der kulturellen und der serologischen Befunde	51
4.4. Methodische Aspekte im Zusammenhang mit dem Nachweis der Leptospirurie	52
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	58
Verdankungen	63
Lebenslauf	64

1. EINLEITUNG UND LITERATURUEBERSICHT

1.1. Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Prävalenz der Leptospirose bei Hunden in der Schweiz zu ermitteln.

Unmittelbarer Anlass für die Untersuchung war die schwere Erkrankung eines Tierpflegers des Biologischen Zentrallaboratoriums am Universitätsspital Zürich an Leptospirose. Die Infektion war von einem Hund mit klinisch manifester Leptospirose erworben worden. (WEIHE, 1984).

Untersuchungen von FEIGIN et al. (1973), welche nachgewiesen haben, dass auch gegen Leptospirose geimpfte Hunde Leptospiren auf den Menschen übertragen können, weisen auf die Tatsache hin, dass dem Hund auch nach der Einführung der fakultativen Impfprophylaxe eine Bedeutung als Infektionsquelle für diese Krankheit von Mensch und Tier zukommt. Aus diesem Grund und weil die Leptospiroseprophylaxe beim Hund nur gegen eine beschränkte Anzahl von Leptospirentypen durchgeführt wird, erschien eine Ueberprüfung der aktuellen epidemiologischen Situation sinnvoll.

Seit dem Auftreten der Stuttgarter Hundeseuche in Zürich im Winter 1944/45 (JENNY und KANTER, 1946) und den Untersuchungen von FREUDIGER (1955) konnten keine Publikationen über die Leptospirenprävalenz bei Hunden in der Schweiz gefunden werden.

Weil die Vakzination die Häufigkeit von Antikörpern beeinflussen und dadurch die Resultate einer serologisch-epidemiologischen Untersuchung verfälschen kann, wurde angestrebt, die Krankheitserreger zu isolieren. Ausserdem wurde dadurch eine Identifikation der am epidemiologischen Geschehen beteiligten Serotypen ermöglicht. Aufgrund des Entwicklungsstandes der Technik des kulturellen Erregernachweises, insbesondere der Verfügbarkeit eines Selektivzusatzes, schienen solche Versuche nicht aussichtslos. Dadurch ergab sich die Notwendigkeit, Harnproben optimaler Qualität und Frische von nicht antibiotisch vorbehandelten Hunden zu untersuchen, ohne dass das Untersu-

chungsgut einer einseitig geographischen oder gesundheitlichen Auslese unterlag. Diesen Bedingungen konnte durch die Untersuchung der neuerworbenen Hunde des Biologischen Zentrallaboratoriums weitgehend entsprochen werden.

Die Harnbeschaffenheit ist für den Erfolg des kulturellen Erregernachweises von grosser Bedeutung. Daher wurde der entsprechenden Vorbereitung der Hunde, das heisst einer pharmakologischen Behandlung zur Verbesserung der Harneigenschaften, grosses Gewicht beigemessen.

1.2. Historischer Ueberblick über die Leptospirose beim Hund

Im Jahre 1852 wurde von HOFER (zit. n. ZWIERZCHOWSKI, 1967) eine Krankheit mit Urämie, hämorrhagischer Diathese und Gastroenteritis unter der Bezeichnung Hundetyphus beschrieben, welche KLETT (zit. n. ZWIERZCHOWSKI, 1967) im Jahre 1898 im Anschluss an eine Epidemie als Stuttgarter Hundeseuche bezeichnete. WIRTH und SCHMIEDINGER (1921, zit. n. GSELL, 1952) betonten die Nierenschädigung bei Hunden, welche an dieser Krankheit litten und LUKES (1923) fand in Nierenschnitten solcher Hunde Spirochäten, welche der Japaner INADA (zit. n. KATHE, 1967) im Jahre 1915 bei Menschen, die an der WEIL'schen Krankheit litten, entdeckt und als Spirochaeta icterohaemorrhagiae bezeichnet hatte. WEIL (1886) hatte die nach ihm benannte Krankheit als "eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infektionskrankheit" beschrieben.

MYAJIMA konnte im Jahre 1916 nachweisen, dass die Ratte der Wirt von Spirochäten des WEIL-Typs ist (KATHE, 1967). Diese Rattentheorie hat inzwischen allgemeine Anerkennung gefunden. Für Mensch und Hund haben jedoch auch andere Nager, Wildtiere, Hunde und Nutztiere eine Bedeutung als Infektionsquelle von *L. icterohaemorrhagiae* und andern Leptospiren.

Die Auffassung, dass der Erreger der WEIL'schen Krankheit identisch sei mit jenem der Stuttgarter Hundeseuche, bestand bis 1932 (ZWIERZCHOWSKI, 1967). In diesem Jahr konnten KLARENBECK und SCHUEFFNER (1933, zit. n. Zwierzchowski, 1967) aus Hunden, die an Stuttgarter

Hundeseuche erkrankt waren, Leptospiren isolieren, die sich serologisch von *L. icterohaemorrhagiae* unterscheiden liessen und als *L. canicola* bezeichnet wurden.

Spätere Arbeiten weisen darauf hin, dass Leptospireninfektionen beim Hund neben den erwähnten akuten und oft tödlichen Verlaufsformen oft einen "atypischen" (JAKSCH et al., 1976), einen chronischen (GREENE, 1984) oder einen subklinischen Verlauf (LOW et al., 1956; CLEGG und HEATH, 1975; SEBEK et al., 1982; GREENE, 1984) nehmen, und dass beim Hund neben den klassischen Leptospirentypen *L. canicola* und *L. icterohaemorrhagiae* auch andere Leptospiren von pathogener Bedeutung sind (GSELL, 1952; FREUDIGER, 1955; FRASER et al., 1973; SEBEK und WURST, 1975).

1.3. Bedeutung des Hundes als Infektionsquelle für den Menschen

Ueber die Bedeutung der Leptospirose als Zoonose sei auf die Ueberichtsarbeiten von TORTEN (1979) verwiesen.

Klinisch manifeste Leptospirosen des Menschen werden oft auf Kontakt mit Harn von infizierten Hunden zurückgeführt (LEPTOSPIROSIS REFERENCE LABORATORY, 1982). Bei den betreffenden Hunden muss sich die Infektion nicht klinisch manifestieren. FEIGIN et al. (1973) konnten sogar nachweisen, dass *L. icterohaemorrhagiae* über den Harn geimpfter, klinisch gesunder Hunde auf den Menschen übertragen werden und zu schwerer Erkrankung führen kann. CLEGG und HEATH (1975) berichteten von der Uebertragung einer *Icterohaemorrhagiae*-Leptospirose auf einen Menschen durch den Biss eines klinisch gesunden Hundes.

In bezug auf die Schweiz sei auf die Arbeit von GSELL und KANTER (1945) hingewiesen, welche von der Erkrankung eines Tierarztes an *Canicola*-Fieber nach dem Auftreten der Stuttgarter Hundeseuche in Zürich berichtet. Der von WEIHE (1984) geschilderte Fall der Erkrankung eines Tierpflegers soll durch Blut- oder Harnkontakt zustande gekommen sein. Beim Tierpfleger und beim Hund wurden Antikörper gegen *L. canicola* und *L. icterohaemorrhagiae* festgestellt, wobei die Titer-

verläufe und die klinischen Krankheitsbilder deutlich auf eine Infektion mit *L. icterohaemorrhagiae* hinwiesen.

Auch andere, nichtklassische Leptospirosen des Hundes sind für den Menschen von Bedeutung. So berichteten FRASER et al. (1973) über 7 Leptospirosepatienten, welche durch einen Hund, der an einer Autumnalis-Leptospirose starb, angesteckt wurden und klinisch erkrankten. Zusätzlich wurden bei 5 Tierärzten, welche den Hund behandelten, Antikörper gegen die Serogruppe Autumnalis gefunden.

WEIHE (1984) machte darauf aufmerksam, dass bei ikterischen und grippösen Krankheitsbildern von Mensch und Hund die Leptospirose weit ausserhalb der ersten diagnostischen Ueberlegungen ist. Auch FAINE (1983) weist auf dieses Problem hin und auf die symptomatologische Verwandtschaft zwischen Leptospirosen und grippeähnlichen Erkrankungen.

Die heute übliche Schutzimpfung bietet den Hunden einen effektiven Schutz vor einer klinischen Erkrankung an Leptospirose (STOENNER, 1976). Jedoch ist die Frage, ob durch die Vakzination die Ausscheidung verhindert wird, umstritten (FEIGIN et. al., 1973; MARSHALL, 1983; SIKORA, 1983; THIERMANN, 1983). SIKORA (1983) stellte fest, dass ernsthafter Zweifel darüber besteht, ob Vakzinationen gegen Leptospirosen die Infektionen verhindern, oder ob sie nur die klinischen Anzeichen abschwächen und derart die Infektionsquellen maskieren.

Hinweise darauf, dass die Besiedlung der Nieren mit Leptospiren vom Immunitätsgrad beziehungsweise von der Vakzinequalität abhängig ist, ergeben sich aus Berichten von HUHN et al. (1975) und von BEY und JOHNSON (1982). Diese Autoren berichteten von verbesserten Vakzinen, die Hunde vor einer Nierenbesiedlung schützen. Sowohl KERR und MARSHALL (1974) als auch BROUGHTON und SCARNELL (1985) konnten bei künstlich mit *L. canicola* und *L. icterohaemorrhagiae* infizierten Hunden, die vorgängig mit einer kommerziellen Vakzinen geimpft worden waren, im Gegensatz zu den Kontrolltieren im Zeitraum von 21 beziehungsweise 14 Tagen nach Infektionsbeginn keine Leptospiren aus Blut, Harn und Nieren isolieren. Sie schlossen daraus, dass die je-

weils verwendete Vakzine die Nierenbesiedlung mit Leptospiren und die Ausscheidung wirksam verhindern konnte.

1.4. Epidemiologische Untersuchungen über Leptospirose beim Hund im deutschsprachigen Raum

BRUNNER et al. (1951) fanden in der Ostschweiz bei 34% von 302 Hunden Antikörper gegen Leptospiren, wobei 2 Drittel der positiven Reaktionen auf *L. canicola* und 1 Drittel auf *L. icterohaemorrhagiae* entfielen. FREUDIGER (1955) stellte aufgrund der Untersuchung von 53 Hunden aus der Stadt Bern und ihren Vororten mit städtischem Charakter einen Verseuchungsgrad von 32% fest. Untersucht wurden Hunde, welche nicht klinisch an Leptospirose erkrankt waren. In beiden Untersuchungen wurde ein Titer ab 1:100 als positiv betrachtet. Weitere Untersuchungen im deutschsprachigen Raum sind in Tabelle 1 synoptisch dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Auslese des Untersuchungsgutes und Variationen in der Serodiagnostik sind sie nicht für exakte Vergleiche geeignet. Im allgemeinen kann aufgrund dieser Untersuchungen ein Rückgang der Träger von Antikörpern gegen *L. canicola* und eine Zunahme der Träger von Antikörpern gegen *L. grippotyphosa* festgestellt werden. Im deutschen Sprachraum liegen bisher keine Publikationen über kulturelle Untersuchungen zu epidemiologischen Zwecken vor.

1.5. Diagnostik der Leptospirose

1.5.1. Allgemeines

In bezug auf die klinisch-mikrobiologische Diagnostik der Leptospirose beim Hund sei auf GREENE (1984) hingewiesen.

Die WHO (1972) empfiehlt als Standardmethode für die serologische Diagnostik und für epidemiologische Untersuchungen den mikroskopischen Agglutinationstest (MAT). Sie stellt fest, dass die definitive Identifikation infizierender Leptospirenstämme nur durch Iso-lation und Typisierung des Erregers bewerkstelligt werden kann.

Tabelle 1: Vergleichende Darstellung epidemiologischer Untersuchungen über Antikörper gegen Leptospiren bei Hunden im deutschsprachigen Raum

Autoren	Ort/Anzahl der Hunde	Jahr	Auswahl	Untersucht ab Serumverdünnung	Hunde mit Agglutinin	Grenztiter	Positive Hunde
Hübner (1972)	Giessen/ 404	1970	mit andern Erkrankungen vorgestellt	1:200	9,4%	1:400	6,5%
Horsch und Kutschmann (1974)	Berlin und Umgebung/ 555	1971	Militär-, Privat- und Blindenhunde	1: ?	4,7%	1:400	3,6%
Unglaub und Rischer (1974)	Stuttgart/ 113	1970-1973	krankheitsverdächtig	1: 50	44,2%	1:800	17,6%
Jaksch et al. (1976)	Wien und Umgebung/ 2258	1965-1973	in 1. Linie klinisch leptospiroseverdächtig	1:100	12,1%	1:300	6,0%
Dröge und Vick (1977)	Oldenburg/ 167	1974-1975	krankheitsverdächtig	1:100	49,1%	1:500	35,9%
Brem und Weber (1984)	Südbayern/ 100	-	Verdacht auf Leptospirose	1:100	61,0%	1:400	46,0%

1.5.2. Problematik des serologischen Nachweises der Leptospirose beim Hund

1.5.2.1. Typenspezifität des mikroskopischen Agglutinationstestes

Nach GREENE (1984) sind positive Reaktionen nicht zwingenderweise homolog für den einzelnen Leptospirenserovar, weil Kreuzreaktionen häufig sind. Er bezeichnet das Resultat als "potentiell serovarspezifisch".

MENGES et al. (1960) zeigten mit Infektionsversuchen, dass ein früherer Kontakt mit Leptospirenantigenen wegen den Kreuz- und Mitagglutinationen die Interpretation von serologischen Befunden in bezug auf die Serogruppe des aktuellen Infektionserregers erschweren oder verunmöglichen kann. Dieses Problem besteht auch nach der Schutzimpfung. GREENE (1984) und THIERMANN (1984b) weisen auf die Unmöglichkeit hin, mittels serologischer Methoden zwischen infektiions- und vakzinationsbedingten Titern gegen Leptospiren zu unterscheiden.

1.5.2.2. Titerverlauf nach Infektion

Untersuchungen über den langfristigen Titerverlauf nach Leptospireninfektionen sind selten. Darauf machten schon FREUDIGER (1955) und SEBEK und WURST (1975) aufmerksam. Angaben über den langfristigen Titerverlauf bei Hunden nach Infektionen mit *L. canicola* und *L. pomona* finden sich in einer Arbeit von MENGES et al. (1960). Bei 4 Hunden stellten sie im Zeitraum von 115 bis 237 Tagen nach Infektionsbeginn ein Abfallen des Titers gegen *L. canicola* unter 1:16 fest. Bei *L. pomona* betrug dieser Zeitraum 179 bis 293 Tage. Es wurde später zum Teil ein Wiederansteigen der Titer beobachtet. Bei sämtlichen Hunden wurden Kreuzreaktionen mit *L. autumnalis* festgestellt. SEBEK und WURST (1975) erwähnten, dass agglutinierende Antikörper gegen *L. grippotyphosa* bei 86,8% der Hunde über 2 Jahre hinweg erhalten blieben und berichteten, dass eine unspezifische Beeinflussung der Antikörperdynamik gegen Leptospiren durch interkurrente, fieberhafte Infektionen vorkommen kann.

1.5.2.3. Titerverlauf nach Schutzimpfung

Gemäss ACKERMANN et al. (1983a und 1983b) sinken nach Vakzinationen mit verschiedenen handelsüblichen Kombinationsimpfstoffen gegen *L. canicola* und *L. icterohaemorrhagiae* die mit der Agglutinations-Lysis-Reaktion erfassten Antikörper innerhalb eines Jahres ab. Durchschnittlich 3 Monate nach Grundimmunisierung und Revakzination finden sich reziproke geometrische Titermittelwerte von etwas über 100 bis wenig über 1000. Nach 6 Monaten liegen diese Werte etwa bei 100 und nach 9 Monaten unter 100, wobei nach 6 Monaten die Durchschnittswerte gegen *L. canicola* stärker absinken und tiefer liegen als jene gegen *L. icterohaemorrhagiae*. Nach einem Jahr finden sich reziproke Titermittelwerte zwischen 10 und 100.

1.5.2.4. Grenztiter und Infektionsgeschehen

Die Beurteilung eines Leptospiren-Agglutinationstiters als positiv, d.h. als Hinweis auf eine Leptospireninfektion, wird in verschiedenen epidemiologischen Untersuchungen nicht einheitlich vorgenommen. Die in Tabelle 1 erwähnten Autoren beurteilten mehrheitlich einen Titer ab 1:400 als positiv. THIERMANN (1984b) stellte fest, dass insbesondere wegen chronischen Ausscheidern und auch wegen den Vakzinationstitern kein spezifischer Grenztiter für die Etablierung einer Diagnose definiert werden kann.

DOLOWY und REICH (1959) stellten fest, dass auch Hunde, welche serologisch keine Reaktion zeigen, Leptospiren ausscheiden können. MENGES et al. (1966) konnten diese Tatsache insofern bestätigen, als bei 2 von 4 Hunden am 237. Tag nach Infektionsbeginn, d.h. zu einer Zeit, in der keine serologische Reaktion mehr festgestellt werden konnte, noch Leptospiren aus dem Harn nachweisbar waren. Auch THIERMANN (1984a) machte auf die Tatsache aufmerksam, dass aktive Infektionen in Absenz von erkennbaren Agglutinationstitern auftreten können. Deshalb betrachteten es DOLOWY und REICH (1959) und THIERMANN (1984b) als notwendig, dass Aussagen über die Leptospiroseprävalenz durch den Erregernachweis bestätigt werden sollten.

1.5.3. Problematik des kulturellen Leptospirennachweises aus Hundeharn

1.5.3.1. Allgemeines

Weil leptospireninfinzierte Hunde den Erreger während längerer Zeit mit dem Harn ausscheiden können, ergibt sich die Möglichkeit, die Infektion im Harn nachzuweisen. Es wurde von Ausscheidungszeiten bis zu 4 1/2 Jahren berichtet (McINTYRE und SEILER, 1953), wobei wahrscheinlich grosse Unterschiede in bezug auf einzelne Serotypen bestehen (SEBEK et al., 1982). Nach SEBEK und WURST (1974) sollen Leptospiren vom Serotyp Canicola mehrere Monate ausgeschieden werden können, dagegen Leptospirurien mit den Serotypen Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae und Sejroe kurzfristig sein.

Die Probleme der Diagnostik, welche den Nachweis der Leptospirurie betreffen, können im wesentlichen in die Teilaspekte des intermittierenden Auftretens von Leptospiren im Harn, der physikalischen, der chemischen und der mikrobiellen Toxizität des Harnes gegenüber Leptospiren, der Leptospirendichte der Harnproben und, in bezug auf den kulturellen Nachweis, in den Teilaspekt des Verhaltens von Leptospiren in Kulturmedien aufgegliedert werden. Diese Teilaspekte lassen sich bei der Beurteilung eines Misserfolges im Erregernachweis in einer epidemiologischen Untersuchung nicht exakt voneinander abgrenzen.

1.5.3.2. Intermittierendes Auftreten von Leptospiren im Harn

Die Literaturangaben sind spärlich. ALEXANDER et al. (1957) erwähnten ein intermittierendes Erscheinen von Leptospiren im Harn infizierter Hunde. DOLOWY und REICH (1959) bemerkten, dass einige infizierte Hunde nicht dauernd Leptospiren im Harn ausschieden. MENGES et al. (1960), welche während mehr als einem Jahr die Erreger in kürzeren Abständen aus dem Harn zu isolieren versuchten, kamen zur Ansicht, dass die Möglichkeit einer intermittierenden Ausscheidung erwogen werden müsse.

1.5.3.3. Beziehung zwischen Ueberleben von Leptospiren und pH-Wert, osmotischem Druck sowie Dichte des Milieus

1.5.3.3.1. In vitro Untersuchungen mit Laborstämmen

CHANG et al. (1948) stellten fest, dass die Ueberlebenszeit von *L. icterohaemorrhagiae* in sterilem Brunnenwasser bei pH-Werten von 5,0 bis 5,2 etwa 28 bis 30 Stunden, bei pH-Werten von 7,0 bis 7,1 30 bis 32 Tage und bei pH-Werten von 8,3 bis 8,5 etwa 3 bis 4 Tage beträgt. OKAZAKI und RINGEN (1957) fanden, dass *L. pomona* ausserhalb des pH-Bereichs von 6,0 bis 8,4 schnell unbeweglich wurde und nach Aufenthalt in Flusswasser mit diesen Grenzwerten nach 3 bis 4 Tagen nicht mehr vermehrungsfähig war. Beim pH-Wert von 7,2 war sie nach 29 Tagen noch kultivierbar. KAISER und DOETSCH (1976) untersuchten das Ueberleben von Leptospiren in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten und molaren Konzentrationen. Sie erkannten, dass nach einer Exposition von 5 Minuten in 0,5molarer Saccharoselösung mit dem pH-Wert von 7,3 zirka 30%, nach einer Exposition von 15 Minuten zirka 50%, nach 30 Minuten zirka 80% und nach 60 Minuten zirka 97% der Leptospiren die Beweglichkeit nicht wiedererlangten.

Nur wenige Autoren beschäftigten sich mit dem Ueberleben von Leptospiren im Harn. KIRSCHNER und MAGUIRE (1957) stellten fest, dass Leptospiren aus unverdünntem Kuhharn im pH-Bereich von 6,3 bis 7,2 nur weiterpassagierbar waren, wenn die Expositionsdauer weniger als 90 Minuten betrug. Bei pH-Werten von 8,0 bis 8,1 verkürzte sich diese Zeit auf maximal 30 Minuten. GREENE (1984) bemerkte, dass in saurem Hundeharn (pH 5,0 bis 5,5) exponierte Leptospiren 1 1/2 bis 2 Stunden überleben können.

NERVIG und GARETT (1979) erwähnten, dass ein Anstieg der Osmolarität* von 500 auf 1000 mOsm/l bei einem pH-Wert von 7,0 die Sterberate von

*: "Wenn es sich um Konzentrationen osmotisch aktiver Teilchen handelt, werden diese gewöhnlich in Osmol ausgedrückt."..."Osmolalität ist die Zahl Osmol pro kg Lösungsmittel, während Osmolarität die Zahl Osmol pro Liter Lösung bedeutet. Die Osmolarität wird daher durch das Volumen der verschiedenen gelösten Substanzen und die Temperatur beeinflusst, während dies bei der Osmolalität nicht der Fall ist." (GANONG, 1972)

L. hardjoprajitno um das 100-fache und beim pH-Wert von 8,0 um das 1000-fache erhöhte.

1.5.3.3.2. pH-Wert, osmotischer Druck und Dichte von Hundeharn

Nach DUERR und KRAFT (1975) liegt der Harn gesunder Hunde im pH-Bereich zwischen 5,0 und 6,5. JAKSCH und GLAWISCHNIG (1976) gaben als Normalbereich pH-Werte zwischen 6 und 7, KIRK und BISTNER (1981) solche zwischen 5,0 und 7,0 an.

KETZ (1974) beurteilte die physiologischen Schwankungen der Gesamtmolarität des Harnes als beträchtlich. Er gab für den Hund eine mittlere Gesamtmolarität von 1080 (Standardabweichung (SD) = 350) mMol/l und eine mittlere Dichte von 1030 (SD = 15) an. GANS und MERCER (1977) gaben für die mittlere Dichte von Hundeharn einen Wert von 1025 an. LEVITIN et al. (1962, zit. n. GANS und MERCER, 1977) wiesen auf beträchtliche Unterschiede in der Osmolalität von Hundeharn hin. Nach Wasserdiurese beim Hund erhielten sie einen Mittelwert von 70,6 (SD = 16,6) mOsm/kg und nach 24-stündiger Dehydratation stieg der Mittelwert auf 1725 (SD = 361) mOsm/kg.

1.5.3.3.3. pH-Wert, osmotischer Druck und Dichte von kulturell positiven und negativen Harnproben

HUBBERT und SHOTTS (1966) verglichen die Harnproben von 19 Hunden eines Zwingers, welcher von einer Leptospirotenendemie betroffen war. Bei 153 Isolierungsversuchen konnten sie von 10 Hunden 37 *L. canicola* Isolate gewinnen. Bei einem Vergleich der pH-Werte sowie der Dichte der positiven und der negativen Harnproben stellten sie fest, dass die positiven Proben im pH-Bereich von 5,5 bis 8,0 lagen und einen mittleren pH-Wert von 6,89 aufwiesen. Die negativen Proben lagen im pH-Bereich von 5,0 bis 7,0 und wiesen einen Mittelwert von 5,96 auf. In bezug auf die Dichte unterschieden sich die beiden Gruppen nur unbedeutend. Die Dichte lag im Mittel bei den positiven Proben bei 1032 und bei den negativen bei 1028 (Dies entspricht ungefähr einer Osmolalität von 1190 mOsm/kg, beziehungsweise von 1048 mOsm/kg).

Aus der Untersuchung von THIERMANN (1980), welcher zum Zwecke der Al-

kalisierung des natürlicherweise eher sauren Hundeharns den Hunden auf 25 bis 40 kg Körpergewicht 7 g Bikarbonat per Os verabreichte, geht hervor, dass der Nachweis der Leptospiurie nur dann gelang, wenn die Harnproben im pH-Bereich zwischen 6,6 und 8,0 lagen. Er vermutete, dass neben der Azidität noch ein anderer Faktor für das Überleben von Leptospiren im Harn von Bedeutung sei.

NERVIG und GARRETT (1979) nahmen an, dass die Nachweisbarkeit der Leptospiurie bei Kälbern neben den pH-Werten mit der Osmolarität des Harnes in Verbindung stehe. Durch eine Vorbehandlung mit Furosemid konnten sie einerseits die Harn-pH-Werte, welche ursprünglich zwischen 8,18 und 9,32 lagen, in den Bereich von 6,35 bis 8,52 senken und andererseits die mittlere Harnosmolarität von ursprünglich 725 mOsm/l ungefähr auf die Hälfte senken. Der Nachweis der Leptospiurie gelang nur nach der Vorbehandlung mit Furosemid und konnte nur aus Harnproben erbracht werden, deren Osmolarität unter 616 mOsm/l und deren pH-Wert im Bereich von 6,35 bis 8,52 lag. In bezug auf die pH-Werte und die Osmolarität von positiven, beziehungsweise negativen Harnproben, welche nach Applikation von Furosemid untersucht wurden, konnten sie allerdings keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Aus einer Arbeit von BROUGHTON und SCARNELL (1985) geht hervor, dass sie nach Applikation von Furosemid bei je 6 künstlich mit *L. canicola* beziehungsweise mit *L. icterohaemorrhagiae* infizierten Hunden im Zeitraum von 1 bis 14 Tagen nach der Infektion aus 43 (62,3%) von 69 Harnproben Leptospiren kulturell nachweisen konnten. Der Nachweis von *L. canicola* gelang bei 84,8% und jener von *L. icterohaemorrhagiae* bei 44,4% der Harnproben, wobei jeweils aus jeder Probe zwei Kulturserien in je drei Verdünnungsstufen angesetzt worden waren. Angaben über die Furosemiddosis und die Harnparameter fehlen.

1.5.3.4. Beziehung zwischen Harnentnahmetechnik, unspezifischem Keimgehalt der Harnproben und Kontamination der Leptospirenkulturen

MENGES et al. (1960) stellten fest, dass aus einer Serie von 27 Harnproben, welche durch Harnblasenpunktion an künstlich mit *L. pomona*

und später mit *L. canicola* infizierten Hunden entnommen worden waren, 48% Kontamination zeigten. Aus dieser Serie konnten keine Leptospiren kultiviert werden. Mit Hilfe einer verbesserten Punktionstechnik konnten sie in einer zweiten Serie von 60 Harnproben die Kontaminationsrate auf 15% senken und aus 46% der Harnproben Leptospiren isolieren. Sie führten den Misserfolg der ersten Serie zum Teil auf die Harnprobenkontamination zurück.

Arbeiten von OSBORNE et al. (1972) und CARTER et al. (1978) zeigten, dass durch eine verbesserte Harnentnahmetechnik die Keimzahlen reduziert werden können. OSBORNE et al. (1972) führten das bessere Ergebnis bei der Cystocentesetechnik im Vergleich zu Harnentnahmen mit Katheter auf eine Reduktion methodisch unvermeidbarer Kontamination zurück. Die gleichen Autoren wiesen aber auch auf eine signifikante Reduktion des Bakteriengehaltes bei Harnproben von Hunden hin, welche mit Furosemid vorbehandelt wurden.

Durch Beigabe von 5-Fluorouracil zu den Leptospirenmedien können die kontaminationsbedingten Ausfälle beim kulturellen Nachweis von Leptospiren weitgehend unter Kontrolle gebracht werden. JOHNSON und ROGERS (1963) bemerkten, dass es möglich sei, Harnproben für den Leptospirennachweis durch Beigabe dieses Selektivzusatzes von Kontaminanten zu befreien. Die Beigabe von 5-Fluorouracil ersetzt jedoch nicht die anderen kontaminantenreduzierenden Massnahmen. NERVIG und GARRETT (1979) arbeiteten mit 5-fluorouracilhaltigen (0,1 mg/ml) Kulturmedien nach ELLINGHAUSEN (1973) und beobachteten, dass 71,4% der Leptospirenkulturen, welche mit Mittelstrahlharn von Kälbern angesetzt worden waren, eine Kontamination zeigten. Durch die intravitale Verdünnung des Harnes mit Furosemid konnten sie den Anteil der kontaminierten Kulturen auf 7,1% senken.

1.5.3.5. Beziehung zwischen Leptospirendichte und mikroskopischer oder kultureller Nachweisbarkeit von Leptospiren im Harn

Angaben über die Leptospirendichte im Harn von künstlich mit *L. hardjo* infizierten Kälbern nach Gabe von Furosemid stammen von NERVIG und GARRETT (1979). Sie ermittelten auf der Basis von Verdünnungsreihen eine Dichte von 10 bis 100 Leptospiren pro ml Harn. Diese

Dichte reicht nicht für einen mikroskopischen Nachweis, welcher nach TURNER (1970) 10'000 bis 20'000 Leptospiren pro ml voraussetzt.

Die Nachweisversuche von BROUGHTON und SCARNELL (1985) zeigten, dass die Leptospirendichte im Hundeharn nach Furosemidapplikation durch zusätzliche Verdünnungen oder Reduktion der verimpften Harnmenge schnell in einen Bereich geraten kann, welcher für den kulturellen Nachweis nicht mehr genügt. Aus allen Harnproben, welche sich kulturell als leptospirenhaltig herausstellten, gelang der Nachweis, bezogen auf *L. icterohaemorrhagiae* (eingeklammerte Prozentzahlen beziehen sich auf *L. canicola*) zu 84,4% (71,4%) aus Kulturen, die mit 0,5 ml, zu 59,4% (53,6%) aus Kulturen, die mit 0,01 ml und nur zu 21,9% (30,4%) aus Kulturen, welche mit 0,0002 ml Harn angesetzt worden waren. Mit Abnahme der inokulierten Harnmenge verringerte sich jedoch ebenfalls die Rate der kontaminationsbedingten Ausfälle. Sie sank von 17,4% auf 5,1% und 1,4%.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsgut

2.1.1. Herkunft und Anamnese der Hunde

Die untersuchten Hunde stammten aus dem Versuchstierbestand des Biologischen Zentrallaboratoriums am Universitätsspital Zürich. Es handelte sich um frisch erworbene Hunde, welche von einem Tierhändler mit Geschäftssitz im schweizerischen Mittelland mehrheitlich aus bäuerlich-ländlichen Gebieten eingekauft wurden.

Es konnten keine Auskünfte über die genaue Herkunft und die Anamnese der Einzeltiere beschafft werden. Insbesondere waren keine verlässlichen Angaben über impfprophylaktische Massnahmen erhältlich.

2.1.2. Rassenzugehörigkeit, Geschlecht und Alter der Hunde

Die Rassenzugehörigkeit wurde aufgrund phänotypischer Merkmale festgelegt und ist in Tabelle 2 dargestellt. Das Alter der Hunde wurde in erster Linie nach dem Zustand des Gebisses, und falls dies nicht möglich war, nach dem Habitus des Hundes geschätzt. Das geschätzte Durchschnittsalter des Untersuchungsgutes betrug 2 1/2 Jahre. Eine Aufteilung in Altersklassen findet sich in Tabelle 3. Es wurden 113 (58,9%) unkastrierte Rüden und 79 (41,1%) Hündinnen untersucht.

2.1.3. Zeitraum der Probenentnahmen, Anzahl, Gesundheitszustand und Auswahl der Hunde

Die Probenentnahmen fanden zwischen dem 30. November 1983 und dem 27. November 1984 statt.

Es wurden 192 Hunde serologisch untersucht. Bei 185 dieser Hunde wurde versucht, Leptospiren im Harn nachzuweisen. Bei den übrigen 7 Hunden konnte kein oder kein verwertbarer Harn gewonnen werden. Zur Ermittlung der Prävalenz von Leptospiren wurden nur die 172 Hunde be-

rücksichtigt, bei denen alle Leptospirenkontrollkulturen Wachstum zeigten.

Tabelle 2: Rassenspektrum des Untersuchungsgutes (192 Hunde)

<u>Hunde ohne sichtbare Bastardierung</u>	<u>Anzahl</u>
a) Sennenhunde	
Appenzeller Sennenhund	42
Berner Sennenhund	9
Grosser Schweizer Sennenhund	12
b) andere Rassen	
Belgischer Schäferhund	3
Collie	1
Dachshund	2
Deutsche Dogge	2
Deutscher Schäferhund	18
Dobermannpinscher	1
Hovawart	1
Irish Setter	1
Pekingese	1
Riesenschнауzer	2
Rottweiler	1
Sankt Bernhardshund	4
<u>Hunde mit sichtbarer Bastardierung</u>	<u>Anzahl</u>
a) Sennenhundbastarde	62
b) übrige Bastarde	30

Tabelle 3: Altersverteilung (Schätzung) der 192 untersuchten Hunde

<u>Alter</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Alter</u>	<u>Anzahl</u>
bis 3 Monate	6	30 bis 36 Monate	17
3 bis 6 Monate	0	3 bis 4 Jahre	15
6 bis 12 Monate	36	4 bis 5 Jahre	11
12 bis 18 Monate	43	5 bis 7 Jahre	12
18 bis 24 Monate	31	7 bis 10 Jahre	5
24 bis 30 Monate	16	über 10 Jahre	0

Der Grossteil der Hunde war klinisch ohne wesentliche Befunde (als wesentlich wurden die Befundkategorien a) bis e) in Tabelle 4 definiert), stand aber, bedingt durch den kürzlich stattgefundenen Wechsel in die neue Umgebung, in einer physischen und psychischen Adaptationsphase.

Tabelle 4: Klinische Befunde am Untersuchungsgut (192 Hunde)

<u>Befund</u>	<u>Anzahl Hunde</u>
a) innere Körpertemperatur $\geq 40,5$ °C	2
b) reduzierte Hautelastizität oder eingefallene Bulbi oculi	5
c) ungeformter bis wässriger Kot	11
d) putrides Lochial-oder Vaginalsekret	2
e) Apathie (ohne Befunde a) bis d)	2
f) vermehrtes und trübes Konjunktivalsekret	7
g) vermehrt gerötete Pharyngealschleimhaut und spontaner Husten	2
h) schlechter Ernährungszustand und/oder struppiges, glanzloses Haarkleid oder Dekubitus	15
Hunde mit einem oder mehreren Befunden a) bis e)	17

Die Hunde wurden unabhängig von den klinischen Befunden in die Untersuchung einbezogen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine nach dem Einstellen erworbene Infektion zu vermeiden, wurden nur Hunde, welche sich weniger als 6 Tage im Zentrallabor aufgehalten hatten, in die Untersuchung einbezogen.

2.2. Untersuchung der Hunde auf Antikörper gegen Leptospiren

Im Anschluss an die Identifikation und eine kurze klinische Untersuchung wurde den Hunden aus der Vena cephalica antebrachii Blut entnommen.

Mit dem Blutserum wurde der von COLE et al. (1973) beschriebene mikroskopische Agglutinationstest zum Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren (MAT) durchgeführt. Als Antigene wurden lebende, 6 bis 8 Tage alte Kulturen von Laborstämmen der Serogruppen Australis (Stamm

Ballico), Grippotyphosa (Stamm Mijava), Icterohaemorrhagiae (Stamm Bern), Pomona (Stamm Mezzana) und Tarassovi (Stamm Basel 1 295/51) verwendet. Für die Serogruppe Sejroe stand ein Stamm von *L. hardjo*, welcher ursprünglich von W. A. ELLIS, Belfast bezogen worden war, zur Verfügung. Der Test wurde entsprechend den Angaben von BRIEGER und BRACK (1985) auf Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei alle Proben vorerst in Verdünnung 1:100 untersucht wurden (screening). Bei Agglutination wurde der Test nochmals in Verdünnung 1:100 und in den Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 und 1:6400 durchgeführt. Das Resultat wurde bei 18-facher Vergrößerung unter einer Dunkelfeldlupe und zusätzlich, bei Zweifeln über die Höhe des Endtiters, mit einem Dunkelfeldmikroskop bei 240-facher Vergrößerung abgelesen.

2.3. Nachweis von Leptospiren im Hundeharn

2.3.1. Vorbereitung der Hunde für die Harnentnahme

Im Anschluss an die Blutentnahme wurde den Hunden pro kg Körpergewicht jeweils 0,1 ml Dimazon* injectabile ad us. vet. in Form einer 5%igen Lösung intravenös injiziert.

In unmittelbarer Folge wurde den Hunden pulverisiertes Natriumhydrogenkarbonat, im folgenden Bikarbonat genannt, per Os verabreicht. Das in Portionen von 2, 3, 5, 7 und 9 g vorbereitete Bikarbonat, wurde anfänglich in Fleischbrät eingeknetet angeboten, später aber wegen der schlechten Akzeptanz in Form einer unmittelbar vor der Gabe mit Wasser angesetzten dickflüssigen Suspension mit Wegwerfspritzen in die hintere Maulhöhle gegeben. Bei nicht willfähigen Hunden konnte bisweilen nicht die gesamte Menge verabreicht werden. Die aufgenommene Menge wurde geschätzt und zusammen mit dem Eingabezeitpunkt protokolliert. Anfänglich wurde in Anlehnung an THIERMANN (1980) eine

*: eingetr. Warenzeichen (Hoechst AG, Frankfurt am Main), enthält als Wirkstoff 4-Chlor-n-furfuryl-5-sulfamoylanthranilsäure als 2,2'-Imino-di-äthanol-Salz (=Furosemid)

Dosis von 7 g pro 25 bis 40 kg Körpergewicht appliziert. Sie wurde im Verlauf der Versuche wegen der häufig immer noch zu tiefen pH-Werte des Harns verdoppelt.

Im Anschluss an die Bikarbonatgabe wurde den Hunden Fleischbrät angeboten, um ein Hervorwürgen und Speicheln wegen dem laugenhaften Geschmack des Bikarbonates zu verhindern. Wieder in die Unterkünfte zurückgebracht, wurde ihnen Trinkwasser ad libitum zur Verfügung gestellt und, soweit organisatorisch möglich, wurde den Hunden für etwa 10 Minuten freier Auslauf gegeben, um die Miktion zu stimulieren.

2.3.2. Harnentnahme

Ungefähr 1 1/2 Stunden nach der Vorbereitung, je nach Verfügbarkeit der Hilfe eines Tierpflegers, wurde den Hunden Harn entnommen.

Bei Rüden wurde am stehenden oder seitlich liegenden Tier das Präputium nach kaudal gezogen, um die Penisspitze freizulegen. Mit Zellstofftupfern, welche mit Betadine*-Lösung durchtränkt waren, wurde die Glans penis gereinigt und antiseptisch behandelt. Darauf wurde ein noch teilverpackter, steriler, oberflächenvergüteter und halbflexibler Kunststoffkatheter** mit eingeschweisstem Spritzenansatz durch die Urethra in die Harnblase eingeführt. Nach dem Heraussträufeln der ersten Harntropfen aus dem Katheter in die innere Verpackungsschutzhülle wurde letztere entfernt, und es wurden mit einer sterilen Wegwerfspritze ungefähr 10 bis 20 ml Harn aspiriert (Erstaspirat). Mit einer weiteren Spritze wurden darauf zirka 20 ml Harn entnommen (Zweit aspirat). Diese Spritze wurde sofort samt Inhalt in die innen noch saubere Schutzhülle der Spritze zurückgeschoben, um eine Kontamination am Spritzenansatz zu vermeiden.

Bei Hündinnen wurde die Haut in der Bauch- und Leistengegend mit einer elektrischen Tondeuse geschoren und mit dem erwähnten Des-

* : eingetr. Warenzeichen (Mundipharma AG, Basel), enthält 1% Iod(-Polyvinylpyrrolidon)

** : Portex (eingetr. Warenzeichen) Dog Catheter (Arnolds Veterinary Products Ltd., Reading, England)

infektionsmittel gründlich gewaschen. Um Kontaminationen durch Staubpartikel zu verringern und die Harnentnahme nicht durch Abwehr zu beeinträchtigen, wurde darauf geachtet, dass die Hündin sich möglichst ruhig verhielt. Je nach dem Verhalten der Hündin wurde die Cystocentese (Blasenpunktion) in Anlehnung an OSBORNE et al. (1977) in symmetrischer Rückenlage oder am stehenden Tier durchgeführt. Falls die Harnentnahme mit dieser Methode nicht erfolgreich war, wurde nach Reinigung und Benetzung der Hände und nach Benetzung der Vulva und des Vestibulum vaginae mit dem genannten Desinfektionsmittel, ein gleicher Katheter wie bei den Rüden unter digitaler Führung in das Orificium urethrae externum eingeführt und in die Harnblase vorgeschoben. In Analogie zur Harnentnahme bei Rüden wurden auch bei den Hündinnen 2 Asparate entnommen.

2.3.3. pH-Wert-Bestimmung, wiederholte Bikarbonatgaben und nochmalige Harnentnahmen

Unmittelbar im Anschluss an die Harngewinnung wurde der pH-Wert der Harnprobe mit Hilfe eines portablen elektronischen pH-Messgerätes* im Erstaspirat gemessen und mit dem Harnentnahmezeitpunkt zusammen notiert.

Bei Hunden, deren Harn-pH-Wert $\geq 6,60$ war, wurde nach Möglichkeit eine weitere Bikarbonatgabe in der Größenordnung der ersten appliziert. Bei diesen Hunden und bei Hunden, welchen nicht genügend Harn entzogen werden konnte, oder bei denen mit einer entnahmebedingten Kontamination der Harnprobe gerechnet werden musste, wurde etwa 2 bis 3 Stunden nach der ursprünglichen Vorbehandlung oder später eine weitere Harnentnahme durchgeführt.

Ausserdem wurde bei einzelnen Hunden, von denen zwischen klinischer Untersuchung und Vorbehandlung spontan abgesetzter Harn aufgefangen werden konnte, der pH-Wert dieses Harnes bestimmt.

*: Portamess (eingetr. Warenzeichen) 654 mit Einstabmesskette 406-M6-KN 2 (Knick, elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin)

2.3.4. Osmometrie und Dichtebestimmung des Harns

Bei sämtlichen Harnproben, welche für den Leptospirennachweis verwendet wurden, und bei einigen Spontanharnproben wurden die Osmolalität und die Dichte bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Restmengen der Zweitaspirate, welche jeweils nach dem Ansatz der Kulturen zurückblieben, in dicht verschlossenen Polyäthylentröhrchen bei -20°C eingefroren und dann gruppenweise nach Auftauen und Durchmischen mit einem Osmometer* und einem Refraktometer**, welches auf Dichte skaliert war, ausgemessen.

2.3.5. Kultureller Leptospirennachweis aus Hundeharn

Die Verdünnungs- und Kulturmedien für den Leptospirennachweis entsprachen den Rezepturen, welche BRIEGER und BRACK (1985) benutzten. Als Verdünnungsmedium für den Harn wurde eine bovine Serumalbuminlösung pH 7,20 (BSA) nach THIERMANN (1980) verwendet, die in Mengen von 4,5 ml bereitgestellt wurde. Beim Kulturmedium handelte es sich um das halbfeste und das flüssige EMJH-Medium (ELLINGHAUSEN und McCULLOUGH (1965) modifiziert nach JOHNSON und HARRIS (1967)) mit Zusätzen von 5-Fluorouracil (100 mg/l) und fötalem Kälberserum (10 ml/l). Es wurde in Mengen von 5 ml steril in Röhrchen abgefüllt. Das halbfeste Medium diente für Kulturansätze aus Harn und Harnverdünnungen und deren Folgepassagen. Das flüssige Medium wurde ebenfalls für Folgepassagen von aus halbfestem Medium isolierten Wildstämmen und für die Passage von Laborstämmen gebraucht.

Grundsätzlich gelangten sämtliche Harnproben, welche einen pH-Wert über 6,60 aufwiesen, und bei denen kein Verdacht auf eine entnahmebedingte Kontamination bestand, zur Verarbeitung. Andernfalls wurde die Probenentnahme für die Kultur wiederholt. In einigen Fällen wurde von dieser Regel abgewichen, um bei schwierig zu handhabenden Hunden die Ausfälle infolge vereitelter Probenentnahme oder Kontamination zu verringern.

* : Mikroosmometer Wescor 5100 C (Baumann Medical, Wetzikon)

** : Urikon (Atago, Japan)

Eigene Vorversuche mit sterilfiltriertem Harn, welcher nachträglich mit einem Laborstamm von *L. icterohaemorrhagiae* versetzt wurde, hatten ergeben, dass Kulturen aus solchem Harn nur Wachstum zeigten, wenn der Zeitraum zwischen Leptospireninokulation und Kulturansatz weniger als 30 Minuten betrug. Deshalb wurde darauf geachtet, die frisch entnommenen Harnproben so rasch als möglich weiterzuverarbeiten. Der Zeitraum zwischen Harnentnahme und erstem Kulturansatz, beziehungsweise der ersten Verdünnung der Harnprobe, betrug in der Regel zirka 2 bis maximal 5 Minuten. Sämtliche Kulturen wurden in einem vom übigen Betrieb abgegrenzten Raum angesetzt.

Vom Harn wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-3}) in BSA hergestellt und sowohl vom unverdünnten Harn als auch von jeder Verdünnungsstufe 0,5 ml in 5 ml Kulturmedium übertragen. Nach dem Ansatz der Kultur mit unverdünntem Harn und der ersten Verdünnung wurde zu Kontrollzwecken mit 4,75 ml unverdünntem Harn und 0,25 ml einer 6-bis 8-tägigen Kultur eines Laborstammes von *L. icterohaemorrhagiae* eine Suspension angesetzt. Von dieser Leptospirensuspension wurden jeweils 0,5 ml unverdünnt und in 100-facher Verdünnung auf 2 Kulturröhrchen verimpft.

Die Kulturen wurden bei 28°C bebrütet und während der ersten 8 Wochen in wöchentlichen, ab der 8. Woche in 2-wöchentlichen Abständen auf Leptospiren und Kontaminanten geprüft. Es wurden jeweils 10 bis 20 Blickfelder eines oder mehrerer Tropfen aus dem Kulturröhrchen jeder Verdünnungsstufe bei 240-facher Vergrößerung unter dem Dunkelfeldmikroskop durchgemustert. Positive Kulturen wurden in mehreren wöchentlichen bis 2-wöchentlichen Passagen an flüssiges Medium adaptiert.

2.3.6. Mikroskopischer Leptospirennachweis aus Hundeharnproben

Im Zeitraum von 1 bis 7 Stunden nach Entnahme der Harnproben wurden jeweils mindestens 2 Tropfen der unverdünnten und der unmittelbar nach der Harnentnahme 10-fach verdünnten Harnprobe unter einem Dunkelfeldmikroskop auf Leptospiren untersucht.

Nach dem Kulturansatz wurde der Rest der Harnproben bei -20°C gelagert. Später wurden jene Harnproben, welche sich im kulturellen Nachweis als leptospirenhaltig erwiesen hatten, in Anlehnung an die

Methode von WHITE und RISTIC (1959, zit. n. POPP, 1967) mit einem gegen Leptospiren hochtitrigen mit Fluoreszeinisothiocyanat markierten Kaninchenserum gefärbt. Das Serum stammte aus der von BRIEGER und BRACK (1985) beschriebenen Immunisierung mit einem L. hardjo-Stamm. Zur Kontrolle der Methodik wurden die betreffenden Harnproben mit den aus ihnen gezüchteten Leptospiren angereichert, eingefroren und dann parallel zu den eigentlichen Proben gefärbt.

2.4. Weitere bakteriologische Untersuchung der Harnproben

Zur Erfassung unspezifischer Keime wurden die Harnproben zusätzlich kulturell untersucht.

Es wurden jeweils 0,2 ml Harn aus dem Zweitaspirat in 1 ml Serum-bouillon (Trypticase Soy Broth (Nr. 11768, BBL, Cockeysville, USA) mit Zusatz von 0,1% Glucose und 6,5% Pferdeserum) inkubiert und nach 24 bis 36 Stunden Bebrütung bei 37°C beurteilt.

Zugleich wurde je eine Oese Harn auf einer Blutagarplatte (Trypticase Soy Agar (Nr. 11043, BBL, Cockeysville, USA) mit Zusatz von 5% Schafblut) und einer Blauagarplatte (Bromthymolblau-Laktose-Agar Nr. 1639, Merk, Darmstadt, BRD) ausgestrichen. Nach einer Bebrütungszeit von 24 bis 48 Stunden bei 37°C wurden die Keime bestimmt und die Kulturen semiquantitativ ausgewertet.

Bei Proben, die in der Serumbouillon Wachstum ergaben, wurde diese auf obengenannte feste Nährböden überimpft.

Je ein Tropfen der Harnproben wurde auf eine Hemmstoffplatte (1 ml Sporensuspension B. subtilis BGA (Nr. 1064a, Merk, Darmstadt, BRD) pro Liter Test-Agar pH 6 (Nr. 10663, Merk, Darmstadt, BRD) aufgebracht, um nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C bakterienhemmende Stoffe festzustellen.

3. RESULTATE

3.1. Häufigkeit von agglutinierenden Antikörpern gegen Leptospiren

3.1.1. Gesamthäufigkeit von Seren mit Endtitern ab 1:100

51 (26,6%) von 192 Hunden wiesen im Serum gegen einen oder mehrere der 7 verwendeten Leptospirenteststämme einen MAT-Titer von 1:100 oder höher auf. In Tabelle 5 sind die Hunde nach dem jeweils erreichten Endtiter aufgeschlüsselt.

Tabelle 5: Relative Häufigkeit der Hunde mit MAT-Titern gegen einen oder mehrere der 7 verwendeten Serogruppen (192 Hunde = 100%)

Endtiter (reziproker Wert):	<100	100	200	400	800	1600	3200
Relative Häufigkeit (%):	73,4	2,1	10,4	5,2	4,7	3,6	0,5

3.1.2. Einfach- und Mehrfachagglutinationen

Bei den genannten 51 Seren wurde im MAT in 30 Fällen Agglutination einer Serogruppe, in 11 Fällen Agglutination von 2, in 9 von 3 Serogruppen und in 1 Fall Agglutination von 4 Serogruppen mit Titern ab 1:100 festgestellt. Bei 7 Seren lagen die Endtiter gegen 2 Serogruppen gleich hoch, so dass die Reaktionen aufgrund der relativen Endtiterhöhe nicht eindeutig einer Serogruppe zugeordnet werden konnten.

3.1.3. Teilhäufigkeiten von Endtitern ab 1:100 gegen einzelne Leptospirenserogruppen

Agglutinationen mit Titern ab 1:100 gegen *L. pomona* und *L. tarassovi* wurden nicht festgestellt.

Die Titer gegen die restlichen 5 für die Untersuchung verwendeten Serogruppen sind in Tabelle 6 und Abbildung 1 dargestellt. Die Ta-

belle 6 stellt die Resultate unter Weglassung von Mitagglutinationen in niedrigeren Verdünnungsstufen in vereinfachter Form dar. Die Abbildung 1 berücksichtigt auch die Mitagglutinationen in niedrigeren Verdünnungsstufen des Serums, wobei die Endtiterhöhe gegenüber der aufgeführten Serogruppe in Beziehung zur relativen Endtiterhöhe gegen die mitagglutinierenden, heterologen Serogruppen dargestellt ist.

Tabelle 6: Häufigkeit der Hunde mit MAT-Titern gegen Leptospiren, aufgeschlüsselt nach Titerhöhe und Serogruppe (192 Hunde, 7 Serogruppen)

Titer	Serogruppe*	Anzahl Hunde
1:3200	Icterohaemorrhagiae	1
1:1600	Australis und Grippotyphosa	1
	Australis	2
	Grippotyphosa	2
	Icterohaemorrhagiae	2
1: 800	Australis und Sejroe	1
	Australis	1
	Canicola	1
	Grippotyphosa	5
	Sejroe	1
1: 400	Australis und Icterohaemorrhagiae	1
	Grippotyphosa und Icterohaemorrhagiae	1
	Australis	3
	Grippotyphosa	4
	Icterohaemorrhagiae	1
1: 200	Australis und Icterohaemorrhagiae	2
	Grippotyphosa und Icterohaemorrhagiae	1
	Australis	2
	Canicola	1
	Grippotyphosa	12
	Icterohaemorrhagiae	2
1: 100	Grippotyphosa	3
	Icterohaemorrhagiae	1
1:<100		141

*: Mitagglutinationen in niedrigeren Serumverdünnungen mit heterologen Serogruppen werden in dieser Tabelle nicht berücksichtigt (vgl. Abbildung 1)

Abbildung 1: Relative Häufigkeit der Hunde mit MAT-Titern ab 1:100, aufgeschlüsselt nach Serogruppe und unter Berücksichtigung von Mitagglutinationen (192 Hunde = 100%, kumulative Darstellung)

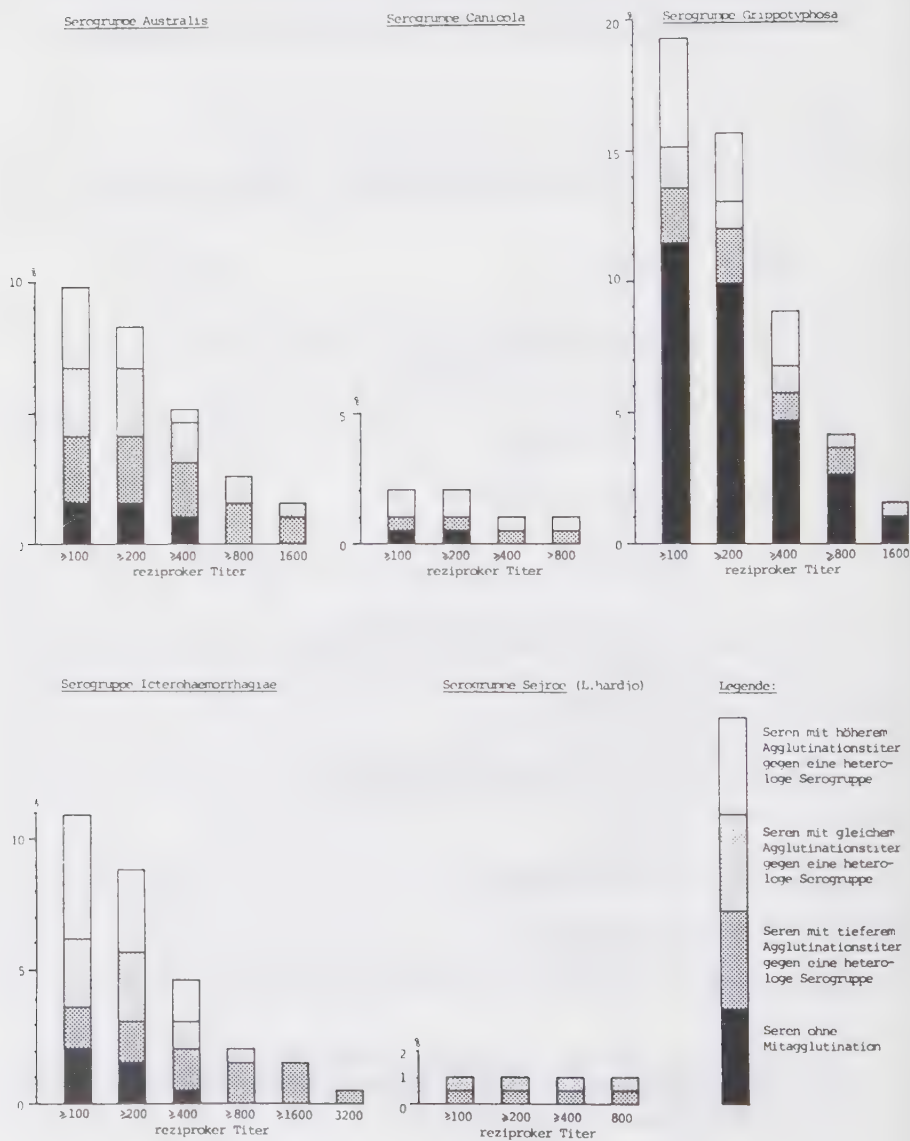


Tabelle 7: Relative Häufigkeit von Hunden mit MAT-Titern ab 1:100 gegen Leptospiiren, aufgeschlüsselt nach Altersklasse, Geschlecht und Untersuchungszeitraum

Anzahl Hunde (100%)	Anteil der Hunde (%) mit MAT-Titer* ab 1:100 gegen										Mitaggluti- nationen mit gleichem Endtiter (%)
	alle Serogruppen	Serogruppe Australis	Serogruppe Canicola	Serogruppe Grippotyph.	Serogruppe Icterohaem. Sejroe	Serogruppe mit gleichem Endtiter (%)					
Altersklasse											
bis 3 Monate	6	0	0	0	0	0					
3 bis 6 Monate	0	-	-	-	-	-					
6 bis 12 Monate	36	22,2	5,6	16,7	3,0	2,8					
12 bis 18 Monate	43	23,3	2,3	18,6	7,0	4,7					
18 bis 24 Monate	31	35,4	12,9	16,1	6,5	3,2					
2 bis 3 Jahre	33	27,3	6,1	21,2	3,0	3,0					
über 3 Jahre	43	30,2	9,3	7,0	11,6	4,6					
Geschlecht											
männlich	113	26,5	4,4	16,8	6,2	2,7					
weiblich	79	26,6	10,1	12,7	6,3	5,1					
Untersuchungszeitraum											
Januar bis März	42	26,2	4,8	11,9	9,5	4,8					
April bis Juni	46	23,9	4,3	17,4	4,3	2,2					
Juli bis September	42	33,3	9,5	21,4	2,4	4,8					
Oktober bis Dezember	62	24,2	8,1	11,3	8,1	3,2					
gesamte Stichprobe	192	26,6	6,8	15,1	6,3	3,6					

*: Mitagglutinationen in niedrigeren Serumverdünnungen mit heterologen Serogruppen werden in dieser Tabelle nicht berücksichtigt. Mitagglutinationen mit gleichem Endtiter wurden mehrfach zugeordnet.

3.1.4. Beziehung zwischen Alter der Hunde, Geschlecht, Untersuchungszeitraum und Ausfall des mikroskopischen Agglutinationstestes

Die Aufschlüsselung der Hunde mit Titern ab 1:100 nach Alter, Geschlecht und Untersuchungszeitraum ist in Tabelle 7 dargestellt. Bei über 3 Jahre alten Hunden wurden vermehrt Reaktionen mit der Serogruppe Icterohaemorrhagiae festgestellt. Bei den Rüden fand sich ein höherer Anteil an Reaktionen mit der Serogruppe Grippotyphosa und bei den Hündinnen waren vermehrt Reaktionen mit der Serogruppe Australis vertreten. Zwischen Juli und September wurde die höchste Rate an Hunden mit Titern festgestellt, welche in erster Linie auf die Serogruppen Grippotyphosa und Australis entfielen. Im Winterhalbjahr bestand eine Häufung von Reagenten gegen die Serogruppe Icterohaemorrhagiae.

3.2. Prävalenz der Leptospirurie

Bei 7 Hunden konnten Leptospiren kulturell im Harn nachgewiesen werden. Bezogen auf 172 Hunde, bei welchen sämtliche Kontrollkulturen positiv verliefen, betrug die kulturell nachgewiesene Prävalenz 4,1%. *L. lora* (Serogruppe Australis) war mit 4 Fällen (2,3%), *L. saxkoebing* (Serogruppe Sejroe) mit 2 Fällen (1,2%) und *L. hardjo* (Serogruppe Sejroe) mit 1 Fall (0,6%) beteiligt.

Die Serotypisierung der Isolate wurde durch das WHO-Zentrum für Leptospirose in Amsterdam durchgeführt.

Das Signalement und die klinischen Befunde der Hunde mit nachgewiesener Leptospirurie sind in Tabelle 8 dargestellt. Bei der klinischen Untersuchung dieser Hunde konnten keine wesentliche Befunde erhoben werden. Die Beziehung zwischen der Serogruppe der nachgewiesenen Leptospiren und der Gruppenspezifität der Serumantikörper ist in Tabelle 9 ersichtlich. Zwischen den ersten und den späteren Blutentnahmen standen die Hunde in medizinischen Versuchen und wurden zum Teil antibiotischen Behandlungen unterzogen.

Tabelle 8: Hunde mit Leptospirose: Untersuchungsdatum, Signalement, Leptospirenbefund und klinischer Befund

Untersuchungs- datum	Hund Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter	Leptospiren- Serotyp im Harn	Besondere klinische Untersuchungsbefunde
3.11.1983	256/83	Grosser Schweizer Sennenhundbastard	männlich	4 J.	L. hardjo (Serogruppe Sejroe)	keine
14.12.1983	277/83	Appenzeller Sen- nenhundbastard	männlich	2 1/2 J.	L. lora (Serogruppe Australis)	trübes Präputial- sekret
21.12.1983	280/83	Appenzeller Sen- nenhundbastard	weiblich	7 Mte.	L. lora (Serogruppe Australis)	keine
10. 1.1984	1/84	Grosser Schweizer sennenhund	männlich	6 J.	L. lora (Serogruppe Australis)	keine
10. 1.1984	2/84	Grosser Schweizer Sennenhund	männlich	6 J.	L. saxkoebing (Serogruppe Sejroe)	keine
10. 7.1984	140/84	Collie	männlich	2 1/2 J.	L. saxkoebing (Serogruppe Sejroe)	schlechter Er- nährungsstatus
25. 9.1984	182/84	Grosser Schweizer Sennenhund	männlich	2 1/2 J.	L. lora (Serogruppe Australis)	keine

Tabelle 9: Hunde mit Leptospirurie: Serologische Befunde (n.u.: nicht untersucht)

Hund	Kultureller Harnbefund (Serogruppe)	1. serologischer Befund (Serogruppe/Titer)	Abstand zwischen 1. und 2. serologischem Befund	2. serologischer Befund (Serogruppe/Titer)
256/83	Sejroe	negativ	96 Tage	negativ
277/83	Australis	negativ	n.u.	n.u.
280/83	Australis	Australis 1: 800 Icterohaem. 1: 100	48 Tage	Australis 1: 100
1/84	Australis	Icterohaem. 1: 200	n.u.	n.u.
2/84	Sejroe	Australis 1: 800 Grippotyph. 1: 200 Icterohaem. 1: 400 Sejroe 1: 800	42 Tage	Icterohaem. 1: 200
140/84	Sejroe	Grippotyph. 1: 400	41 Tage	Grippotyph. 1: 800
182/84	Australis	Australis 1:1600 Grippotyph. 1: 400 Icterohaem. 1: 800	21 Tage	Australis 1: 400 Grippotyph. 1: 100 Icterohaem. 1: 400

3.3. Methodische Aspekte und zusätzliche Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Leptospirennachweis aus Hundeharn

3.3.1. Kultureller Nachweis der Leptospirurie

Von den 7 Hunden mit nachgewiesener Leptospirurie wurden insgesamt 11 Harnproben für den kulturellen Nachweis verarbeitet. Aus 9 Harnproben konnten Leptospiren isoliert werden. Die Charakteristika der Proben sind in Tabelle 10 aufgeführt.

2 der 11 Harnproben ergaben negative Resultate. Eines stammte von einem Hund (256/83), welcher zwischen der Entnahme der ersten positiven und der zweiten negativen Harnprobe einer Streptomycinkur unterzogen worden war. Das andere negative Resultat ging aus einer Harnprobe hervor, bei welcher nach der Erstentnahme ein Verdacht auf eine Kontamination bestand, so dass der Hund (277/83) eine Stunde später

Tabelle 10: Harnbeschaffenheit und Ergebnis der Kultur bei Hunden mit Leptospiurie

Hund	/ Harnprobe	pH-Wert	Osmolalität (mOsm/kg)	Unspezi- fischer Keimgehalt	Leptospirenkultur			
					Anzahl Tage bis Leptospiren- kultur mikroskopisch positiv			
					V=1	V=10	V=100	V=1000
256/83	7,61	376	-		28	-	-	-
256/83	6,86	398	-		-	-	-	-
277/83	7,16	359	+		-***	-***	-***	-***
277/83	7,31	478	+		22	-	-	-
280/83	6,43	735	-		-*	33*	29	-
280/83	7,20	315	+		20	-	17	-
1/84	6,95	345	++		24*	22	-	-
2/84	6,43	797	++		29*	-	-	-
140/84	8,41	523	-		-*	28	-	-
140/84	7,95	681	-		-*	28	-	-
182/84	6,91	235	++		-**	20*	-**	-

V : Verdünnungsfaktor des Harns vor der Verimpfung ins Kulturmedium

- : kein Wachstum

+

++ : Wachstum nur in Serumbouillon

++ : Wachstum auf festen Nährböden

* : mikroskopisch leichtgradige Kontamination der Leptospirenkultur

** : mikroskopisch mittelgradige Kontamination der Leptospirenkultur

*** : mikroskopisch starke Kontamination der Leptospirenkultur

einer zusätzlichen Harnprobenentnahme unterzogen wurde. Beide Leptospirenkontrollkulturen der ersten Harnprobe dieses Hundes waren stark kontaminiert und nur die Kontrollkultur aus 100-fach verdünntem Harn verlief positiv.

Unter den 9 positiven Nachweisen finden sich 2 doppelt geführte, wobei in einem Fall (280/83) die zweite Harnprobe 48 Tage nach der er-

sten entnommen wurde. Im anderen Fall (140/84) wurde eine zusätzliche Harnprobe 25 Minuten nach der ersten entnommen, welche wegen ihres hohen pH-Wertes von 8,41 als nicht erfolgversprechend beurteilt wurde. 2 von diesen 9 Harnproben enthielten Staphylokokken und aus 3 dieser Harnproben konnten laktosespaltende Enterobakteriazeen isoliert werden.

Bei sämtlichen Harnproben, die positive Kulturen lieferten, konnte der kulturelle Nachweis nach einer Inkubationszeit von 17 bis 29 Tagen erbracht werden. Nach 33 Tagen Bebrütungszeit wurden bis zum Beobachtungsende keine zusätzlichen Kulturen positiv. Von den 9 positiven Harnproben konnte in je 5 Fällen der Nachweis aus Kulturen, die mit unverdünntem und 10-fach verdünntem Harn angesetzt worden waren, erbracht werden. Nur in 2 Fällen gelang der Nachweis in der Kultur des 100-fach verdünnten Harns, und 1000-fach verdünnter Harn ergab keine positive Kultur. Nur bei einem Drittel der positiven Harnproben gelang der Nachweis aus mehr als einem Kulturröhrchen.

3.3.2. Mikroskopischer Nachweis der Leptospiurie

In keinem Fall war ein direkter dunkelfeldmikroskopischer Nachweis von Leptospiren in Harnproben und deren 10-fachen Verdünnungen erfolgreich. Diese Nachweisversuche wurden an sämtlichen Harnproben durchgeführt.

Ebenso gelang bei den kulturell positiven Harnproben kein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Leptospiren. Sämtliche für diesen Nachweis zur Kontrolle mit Leptospiren versetzten Harnproben brachten eindeutig positive Ergebnisse.

3.3.3. Weitere bakteriologische Untersuchungen der Harnproben

3.3.3.1. Kulturelle Befunde

In 36 (19,5%) der 185 Harnproben konnte eine Trübung der Serumbouillon und in 20 Fällen (10,8%) gleichzeitig ein Wachstum auf den festen Nährböden beobachtet werden. Bei den positiven Kulturen handelte es sich vor allem um laktosespaltende Enterobakteriazeen und gramposi-

tive Kokken. Vereinzelt wurden Proteus und andere nicht identifizierte grampositive Stäbchen festgestellt.

3.3.3.2. Unspezifischer Keimgehalt der Harnproben und Wachstum der Leptospirenkontrollkulturen

Bei 13 von 185 Harnproben zeigte die Kontrollkultur aus unverdünntem, mit Leptospiren versetztem Harn kein Wachstum, wobei in 3 Fällen die Kontrollkultur aus 100-fach verdünntem Harn ebenfalls negativ verlief. Die genannten 13 Fälle sind in Tabelle 11 aufgeführt und las-

Tabelle 11: Leptospirenkontrollkulturen ohne Wachstum des Kontrollstammes, aufgeschlüsselt nach unspezifischem Keimgehalt der Harnproben

Unspezifischer Keimgehalt der Harnprobe	Anzahl der Harnproben	Anzahl der Kulturen ohne Wachstum des Kontrollstammes	
		Ansatz aus unverdünntem Harn	Ansatz aus 100-fach verdünntem Harn
Kein Wachstum	149 (100%)	8 (5,4%)	0
Wachstum nur in Serumbouillon	16 (100%)	1 (6,2%)	0
Wachstum auf festen Nährböden	20 (100%)	4 (20,0%)	3 (15,0%)
Total	185 (100%)	13 (7,0%)	3 (1,6%)

sen sich zusätzlich wie folgt charakterisieren: In einem Fall erwiesen sich die Leptospirenkulturen mikroskopisch stark kontaminiert, obwohl kein Wachstum bei der Untersuchung auf unspezifische Keime beobachtet werden konnte. Es handelt sich wahrscheinlich um eine technisch bedingte Kontamination nach der Probenentnahme. In 3 Fällen wurden simultan ein massiver, unspezifischer Keimgehalt der Harnproben und eine starke mikroskopische Kontamination der Leptospirenkulturen festgestellt. In 2 Fällen konnte wohl ein unspezifischer Keimgehalt der Harnproben, aber keine Kontamination der Leptospirenkul-

turen erkannt werden. Diese beiden Fälle stammten jedoch von Harnproben, die überdurchschnittlich hohe pH-Werte von 8,16 und 8,14 und überdurchschnittlich hohe Osmolalitätswerte von 657 und 790 mOsm/kg aufwiesen. In den übrigen 7 Fällen konnte weder unspezifischer Keimgehalt in den Harnproben noch mikroskopische Kontamination der Leptospirenkontrollkulturen nachgewiesen werden.

3.3.3.3. Abhängigkeit des unspezifischen Keimgehaltes von Geschlecht und Harnentnahmemethode

Eine Aufgliederung der Proben mit unspezifischem Keimgehalt nach Geschlecht der Hunde und Harnentnahmemethode ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Abhängigkeit des unspezifischen Keimgehaltes von Geschlecht und Harnentnahmemethode (185 Hunde)

Geschlecht	Harnentnahmemethode	Probenzahl	Unspezifischer Keimgehalt		
			Wachstum nur in Serum-bouillon	Wachstum auf festen Nährböden	Total
Männlich	Katheter	111 (100%)	7,2%	4,5%	11,7%
Weiblich	Katheter	17 (100%)	29,4%	17,6%	47,1%
Weiblich	Cystocentese	47 (100%)	5,3%	21,1%	26,3%
		185 (100%)	8,6%	10,8%	19,5%

3.3.3.4. Hemmstoffe

Der Hemmstofftest verlief in allen Fällen negativ.

3.3.4. Untersuchung des pH-Wertes, der Osmolalität und der Dichte des Hundeharns

3.3.4.1. pH-Wert und Osmolalität des Harns zum Zeitpunkt der Vorbehandlung und nach der Vorbehandlung

3.3.4.1.1. Auswahl der Harnproben

Diese Untersuchungen beziehen sich auf Harnproben von 147 Hunden. Ausgeschlossen wurden Hunde mit wesentlichen klinischen Befunden (Befunde a) bis e) auf Tabelle 4) und Hunde, deren Harnproben laktose-spaltende Enterobakteriazeen aufwiesen. Mit dieser Einschränkung wurde versucht, Verfälschungen infolge Säurebildung durch pathophysiologische und mikrobielle Prozesse zu vermeiden. Die Angaben über pH-Werte beziehen sich nur auf Spontanharnproben vor der Behandlung und auf Harnproben, die nach einmaliger Bikarbonatgabe gewonnen wurden; jene über Osmolalität beziehen sich ebenfalls auf Spontanharnproben vor der Behandlung und auf Harnproben, die nach ein- oder zweimaliger Bikarbonatgabe für den Leptospirennachweis verwendet wurden. Es handelt sich somit bei den Auswertungen um die gleichen Hunde, aber nicht immer um die gleiche Harnprobe.

3.3.4.1.2. pH-Werte

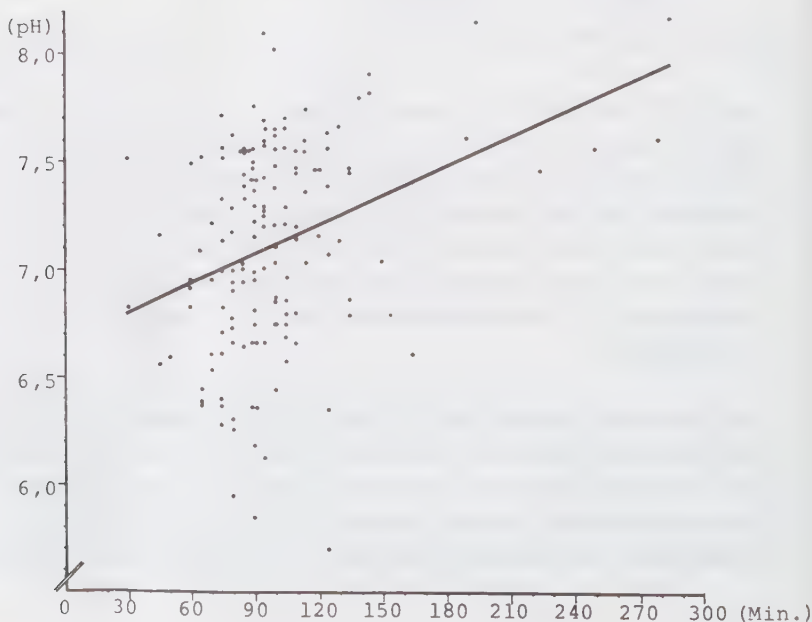
In 58,3% der 24 Harnproben, welche vor der Behandlung gewonnen wurden, konnten pH-Werte unter 6,61 festgestellt werden. Bei den zugehörigen Proben, die durchschnittlich 95 Minuten nach der Behandlung entzogen wurden, reduzierte sich dieser Anteil auf 12,5%. Der mittlere pH-Anstieg zwischen Vorbehandlung und erstem Harnentzug betrug 0,66 (SD = 0,55) pH-Einheiten. Bei zwei Proben wurde ein pH-Abfall festgestellt. Die pH-Verteilung der 24 Probenpaare ist in Tabelle 13 dargestellt.

Der mittlere pH-Wert von 147 Harnproben, welche durchschnittlich 100 (SD = 37) Minuten nach einmaligen Gaben von 5 mg Furosemid i.v. und 657 (SD = 212) mg Bikarbonat per Os (jeweils pro kg Körpergewicht) entnommen wurden, betrug 7,12 (SD = 0,49). 15,6% dieser Proben lagen unter dem pH-Wert von 6,61 und 2,7% über 8,0. Es bestand eine

Tabelle 13: Häufigkeitsverteilung nach pH-Bereich und mittlere pH-Werte von Harnproben, die vor und nach Applikation von Furosemid und Bikarbonat von 24 Hunden gewonnen wurden (Furosemid: 5 mg pro kg Körpergewicht i.v.; Bikarbonat: 605 (SD = 242) mg pro kg Körpergewicht per Os; die Zweitentnahme erfolgte 95 (SD = 36) Minuten nach Applikation)

Entnahme der Proben	Anzahl der Proben im pH-Bereich von						Mittlerer pH-Wert (n = 24)
	5,81- 6,20	6,21- 6,60	6,61- 7,00	7,01- 7,40	7,41- 7,80	7,81- 8,20	
Vor Behandlung	5	9	8	2	0	0	6,51 (SD = 0,35)
Nach Behandlung	1	2	4	8	7	2	7,17 (SD = 0,51)

Abbildung 2: Regressionsgerade von pH-Werten und Entnahmezeitpunkten von 147 Hundeharnproben nach Applikation von 5 mg Furosemid i.v. und einer Gabe von durchschnittlich 657 (SD = 212) mg Bikarbonat per Os (jeweils pro kg Körpergewicht)



lockere (stochastische) und positive Beziehung zwischen den pH-Werten und den Entnahmezeitpunkten. Abbildung 2 veranschaulicht die Streuung der pH-Werte und der Entnahmezeitpunkte sowie die sich daraus ergebende ansteigende Regressionsgerade ($\text{pH} = 6,65 + 0,00446 \cdot t \text{ (Min.)}$). Im Zeitraum zwischen 30 und 285 Minuten nach der Vorbehandlung betrug der Masskorrelationskoeffizient der einfachen linearen Regressionsanalyse 0,35.

3.3.4.1.3. Osmolalitätswerte

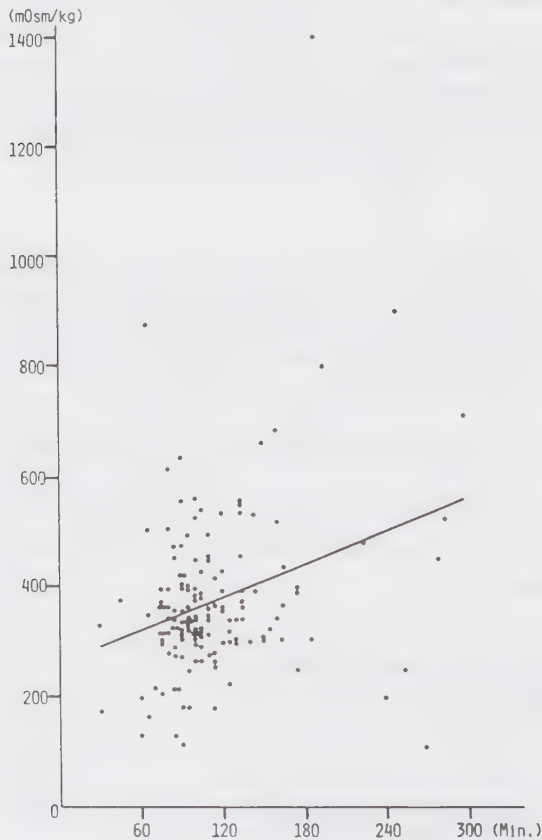
Bei 13 Spontanharnproben, welche vor der Vorbehandlung gewonnen wurden, wurde in 12 Fällen eine Osmolalität über 800 mOsm/kg festgestellt. Bei den zu diesen Proben gehörigen Harnproben, welche durchschnittlich 98 Minuten nach der Vorbehandlung entzogen wurden, lag noch eine Probe über 800 mOsm/kg, beziehungsweise 11 Proben lagen unterhalb von 500 mOsm/kg. Der mittlere Osmolalitätsabfall zwischen Vorbehandlung und Harnentzug betrug 876 (SD = 321) mOsm/kg. Ein Abfall der Osmolalität wurde bei sämtlichen Proben festgestellt. Die Osmolalitätsverteilung der Probenpaare ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Häufigkeitsverteilung nach Osmolalität und mittlere Osmolalität von Harnproben, die vor und nach Applikation von Furosemid und Bikarbonat von 13 Hunden gewonnen wurden (Furosemid: 5 mg pro kg Körpergewicht i.v.; Bikarbonat: 471 (SD = 292) mg pro kg Körpergewicht per Os; die Zweitentnahme erfolgte 98 (SD = 37) Minuten nach Applikation)

Entnahme der Proben	Anzahl der Proben im Osmolalitätsbereich von						Mittlere Osmolalität (mOsm/kg) (n = 13)
	201-500	501-800	801-1100	1101-1400	1401-1700	1701-2000	
Vor Behandlung	0	1	3	3	4	2	1347 (SD = 355)
Nach Behandlung	11	1	0	1	0	0	471 (SD = 292)

Die Auswertung von 147 Harnproben ergab, dass 98,0% der Proben nach der Vorbehandlung mit einer einmaligen Dosis von 5 mg Furosemid i.v. und einer Gesamtgabe von 689 (SD = 229) mg Bikarbonat in einer oder zwei Gaben per Os unterhalb von 800 mOsm/kg lagen. Die mittlere Osmolalität dieser Proben, welche durchschnittlich 115 (SD = 47) Minuten nach Beginn der Vorbehandlung entzogen wurden, lag bei 374 (SD = 155) mOsm/kg. Abbildung 3 veranschaulicht die Streuung der Osmolalitätswerte und der Entnahzeitpunkte der Proben sowie den An-

Abbildung 3: Regressionsgerade von Osmolalitätswerten und Entnahzeitpunkten von 147 Hundeharnproben nach Applikation einer einmaligen Gabe von 5 mg Furosemid i.v. und einer Gabe von durchschnittlich 689 (SD = 229) mg Bikarbonat per Os in einer oder zwei Dosen (jeweils pro kg Körpergewicht)



stieg der Regressionsgeraden ($p \text{ (mOsm/kg)} = 261,21 + 0,98 \cdot t \text{ (Min.)}$) ab 30 Minuten nach der Vorbehandlung. Es wurde eine lockere (stochastische) und positive Beziehung zwischen der Osmolalität und dem Entnahmezeitpunkt der Harnproben festgestellt. Im Zeitraum ab 30 bis 300 Minuten nach der Furosemidgabe betrug der Masskorrelationskoeffizient der einfachen linearen Regressionsanalyse 0,29.

3.3.4.2. Einfluss des pH- und des Osmolalitätswertes der Hundeharnprobe auf das Leptospirenwachstum in den Kontrollkulturen

Eine Aufschlüsselung des Verhaltens der mit unverdünntem Harn angesetzten Kontrollkulturen nach pH-Wert und Osmolalität der Harnproben ist in Tabelle 15 und 16 dargestellt. Von 9 negativen, mikroskopisch nicht kontaminierten Kontrollkulturen, welche mit unverdünntem Harn

Tabelle 15: Anteil der positiven Leptospirenkontrollkulturen, aufgeschlüsselt nach pH-Wert der Harnproben (unter Weglassung der mikroskopisch kontaminierten, negativen Kontrollkulturen)

pH-Bereich:	5,72 - 6,60	6,61 - 7,80	7,81 - 8,16	Total
Anzahl Proben:	8	162	11	181
Anteil der Kontrollkulturen mit Wachstum:	87,5%	98,1%	54,5%	95,0%

Tabelle 16: Anteil der positiven Leptospirenkontrollkulturen, aufgeschlüsselt nach Osmolalität der Harnproben (unter Weglassung der mikroskopisch kontaminierten, negativen Kontrollkulturen)

Osmolalitätsbereich (mOsm/kg):	73 - 500	501 - 800	801 - 1396	Total
Anzahl Proben:	152	24	5	181
Anteil der Kontrollkulturen mit Wachstum:	98,7%	83,3%	40,0%	95,0%

angesetzt worden waren, gingen 8 (88,9%) aus Harnproben hervor, deren pH-Wert bei 7,90 oder höher lag und/oder die eine Osmolalität von 898 mOsm/kg oder höher aufwiesen.

3.3.4.3. Vergleich der Dichte mit der Osmolalität von Hundeharn

Mit Hilfe der einfachen linearen Regressionsanalyse, bezogen auf die refraktometrisch ermittelte Dichte und die Osmolalität von Hundeharn, konnte im Dichtebereich von 1002 bis 1037, beziehungsweise im Osmolalitätsbereich von 109 bis 1396 mOsm/kg ein relativ straffer Zusammenhang der beiden Harnparameter ermittelt werden. Diese Beziehung kann durch die Formel

$$F(d) = 998,444 + 0,0282 \cdot p$$

bei einem Masskorrelationskoeffizienten von 0,96 dargestellt werden. Dabei ist $F(d)$ die bei Zimmertemperatur refraktometrisch ermittelte Dichte mit der Dimension (g/l) und p die Osmolalität (mOsm/kg). Die Stichprobe umfasst 147 Harnproben von 147 Hunden ohne wesentliche klinische Befunde. Die Proben wurden nach Vorbehandlung mit Furosemid und Bikarbonat gewonnen.

4. DISKUSSION

4.1. Serologische Untersuchung

4.1.1. Prävalenz von Antikörpern gegen einzelne Serogruppen

In bezug auf die klassischen Erreger der Hundeleptospirose sei auf die schwache Präsenz der Serogruppe Canicola hingewiesen. Diese Tendenz ist auch in den Untersuchungsergebnissen von HORSCH und KUTSCH-MANN (1974), UNGLAUB und RISCHER (1974), JAKSCH et al. (1976) und BREM und WEBER (1984) ersichtlich. Die Serogruppe Icterohaemorrhagiae ist etwas stärker vertreten. Diese Tendenz spiegelt sich ebenfalls in den genannten Untersuchungen, aber nicht in jener von DROEGE und VICK (1977), welche eine wesentlich höhere Antikörperprävalenz gegen die beiden Serogruppen nachwiesen.

In der Ostschweiz wurden 1951 unter 302 untersuchten Hunden (BRUNNER et al., 1951) 23,5% Träger von Antikörper gegen die Serogruppe Canicola und 10,6% Träger von Antikörper gegen die Serogruppe Icterohaemorrhagiae registriert. Ein starker Rückgang von *L. canicola* ist offensichtlich. Die Arbeiten von SEBEK und WURST (1975), JAKSCH et al. (1976) und SEBEK et al. (1982) weisen auf einen allgemeinen Rückgang dieser Serogruppe in den europäischen Staaten in den letzten Jahrzehnten hin. Eine allgemeine Hygienisierung in der Hundezucht und die Verbreitung der Impfprophylaxe mögen zu diesem Rückgang beigetragen haben. Ein Rückgang der Serogruppe Icterohaemorrhagiae für die Schweiz kann aus methodischen Gründen, das heisst wegen dem unbekannten Anteil an vakzinationsbedingten Titern, weder verworfen noch bestätigt werden. Der relativ hohe Anteil an serologischen Reaktionen mit der Serogruppe Icterohaemorrhagiae im Vergleich zur Serogruppe Canicola könnte auf eine etwas höhere Impftiterpersistenz gegen die erstgenannte Serogruppe zurückgeführt werden. Hinweise dazu ergeben sich aus den Untersuchungen von Ackermann et al. (1983a und 1983b). Andererseits muss davon ausgegangen werden, dass mit der Persistenz der Rattenpopulation auch das Risiko für Icterohaemorrhagiae-Infektionen bestehen bleibt.

Bei den nichtklassischen Erregern der Hundeleptospirose fällt der hohe Anteil von Trägern von Antikörpern gegen die Serogruppe Grippotyphosa auf. Arbeiten von HORSCH und KUTSCHMANN (1974), UNGLAUB und RISCHER (1974), JAKSCH et al. (1976), DROEGE und VICK (1977), SEBEK et al. (1982) und BREM und WEBER (1984) stellten ebenfalls die serologische Dominanz dieser Serogruppe fest.

Zum Vergleich der Frequenz von Agglutininen gegen *L. australis*, die in den eigenen Untersuchungen zu einem grossen Teil durch Mitagglutination in gleicher oder niedrigeren Serumverdünnungen mit Vertretern anderer Serogruppen in Erscheinung traten, können die Angaben von UNGLAUB und RISCHER (1974) herangezogen werden. Diese fanden vor allem Mitagglutinationen in niedrigen Serumverdünnungen und ordneten deshalb nur einen Fall eindeutig dieser Serogruppe zu.

Die eigenen Resultate über die Trägerfrequenz von Agglutininen gegen die Serogruppe Sejroe widerspiegeln weitgehend die Resultate von UNGLAUB und RISCHER (1974), JAKSCH et al. (1976) sowie DROEGE und VICK (1977). BREM und WEBER (1984) fanden in Südbayern bei leptospiroseverdächtigen Hunden wesentlich mehr Träger von Agglutininen gegen die genannte Serogruppe.

Die Absenz von Antikörpern gegen die Serogruppen Pomona und Tarassovia ist vermutlich durch die Modernisierung der Schweinehaltung bedingt, welche den Kontakt von Hunden mit Schweinen und mit Schweineharn, und damit die Infektion mit Leptospiren dieser Serogruppen weitgehend verhindert.

4.1.2. Prävalenz von Antikörpern in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Jahreszeit

Die Verteilung der Träger von Agglutininen in bezug auf das Alter kann wegen des Fehlens einer genügend grossen Anzahl älterer Hunde nicht mit den Untersuchungen anderer Autoren verglichen werden. Auffallend ist der hohe Anteil von über 3-jährigen Hunden, deren Seren mit der Serogruppe Icterohaemorrhagiae reagierten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese älteren Hunde vermehrt geimpft worden

waren und deshalb häufiger Antikörper gegen diese Serogruppe aufwiesen.

HUEBNER (1972) hat bei Rüden deutlich mehr Reagenten gegen Leptospiren gefunden als bei Hündinnen. Diese Feststellung kann in der eigenen Untersuchung nur in bezug auf die Serogruppe Grippotyphosa bestätigt werden. Hingegen war das Geschlechtsverhältnis für alle untersuchten Serogruppen insgesamt ausgeglichen.

Ebenfalls kann die Feststellung des obengenannten Autors bestätigt werden, dass eine Häufung von Reaktionen im Sommer besteht, jedoch wurde eine zweite Häufung in den Herbst- und Wintermonaten, wie sie der genannte Autor beschrieb, nur bei der Serogruppe Icterohaemorrhagiae beobachtet.

4.2. Kultureller Nachweis von Leptospiren aus dem Harn

4.2.1. Zur Oekologie der nachgewiesenen Serotypen

Ueber die Isolierung von *L. hardjo* vom Hund sind dem Autor keine Publikationen bekannt. Der Schweizer Rindviehbestand ist stark mit diesem Serotyp verseucht (BRIEGER und BRACK, 1985).

Erstmalig wurde *L. lora* bei einem Menschen durch MINO in Italien im Jahre 1942 isoliert (HARTMANN et al., 1974). CHERNUKHA und KARASEVA (1965) berichteten von der Isolierung dieses Serotyps aus einer Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) in Russland. HARTMANN et al. (1974) isolierten *L. lora* in Holland von Schweinen, welche aus einem Bestand stammten, in welchem Probleme mit Aborten, Totgeburten und lebensschwachen Ferkeln bestanden.

L. saxkoebing wurde von BORG-PETERSEN im Jahre 1942 aus den Nieren zweier Mäuse isoliert, war aber schon 1940 von MINO in Oberitalien bei an Reisfeldfieber erkrankten Arbeitern und bei einer Waldmaus gefunden worden (LUEBBERS, 1951). Mino ordnete das Isolat ursprünglich *L. sejroe* zu (LUEBBERS, 1951). Die erste Isolierung beim Hund gelang LUEBBERS (1951). Sie erfolgte aus dem Harn eines klinisch gesunden

Hundes, der auf einem Bauernhof in der Nähe von Lübeck lebte. Er berichtete, dass dieser Hund wegen der ausgezeichneten Eignung als Rattefänger auf verschiedenen Höfen eingesetzt wurde, und dass auf dem gleichen Gehöft und im gleichen Jahr vier menschliche klinische Leptospirosen aufgetreten waren, bei welchen serologische Reaktionen gegen *L. sejroe* festgestellt wurden.

4.2.2. Berichte der Literatur über Leptospirennachweise beim Hund im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen

Epidemiologische Untersuchungen auf der Basis des Erregernachweises sind selten. Zwei amerikanische Untersuchungen geben Hinweise auf das Verhältnis zwischen der serologisch erfassten Häufigkeit von Leptospirose und der Frequenz von Leptospiurie bei Hunden.

ALEXANDER et al. (1957) konnten mit Hilfe der Inokulation von Hamstern und anschließender Kultur bei 104 Trägern von Agglutininen gegen Leptospiren (ab Titer 1:25) in 8 Fällen (7,7%) ausschliesslich *L. canicola* aus dem Harn nachweisen. Bezogen auf Hunde mit einem Titer ab 1:400 waren es 15,1%. Die pH-Werte der Harnproben lagen zwischen 6,0 und 7,5.

THIERMANN (1980) fand bei 7 (7,8%) von 90 Trägern von Agglutininen gegen Leptospiren (ab Titer 1:80) *L. copenhageni* (Serogruppe Ictero-haemorrhagiae). Andere Isolierungen gelangen nicht. Er arbeitete sowohl mit der Hamsterinokulation als auch mit der Verimpfung von Harn in ein konventionelles Kulturmedium nach ELLINGHAUSEN und McCULLOUGH (1965). Nur 50% der Proben, welche sich aufgrund der Hamsterinokulation als leptospirenhaltig erwiesen hatten, wurden auch von der Kultur erfasst. Der Harn wurde zum Teil durch perorale Bikarbonatgaben alkalisiert.

In der eigenen Untersuchung erwiesen sich 5 (9,8%) der 51 Hunde mit MAT-Titern ab 1:100 als Leptospirenausscheider. Bezogen auf einen Titer ab 1:400 waren es 23,5%. Diese relativ hohe Rate erfolgreicher Kulturen ist möglicherweise eine Folge der verbesserten Nachweismethodik.

4.3. Gegenüberstellung der kulturellen und der serologischen Befunde

Die Serogruppen Canicola, Grippotyphosa und Icterohaemorrhagiae wurden wohl serologisch, nicht aber kulturell festgestellt.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Diskrepanz bezüglich der Serogruppen Canicola und Icterohaemorrhagiae auf Schutzimpfungen zurückzuführen ist. Der Vergleich der Typenspezifität der Antikörper mit den im Harn gefundenen Serotypen lässt vermuten, dass neben vakzinationsbedingten Agglutininen und Mitagglutininen auch Kreuzreaktionen wesentlich an der Trübung des serologisch-epidemiologischen Gesamtbildes beteiligt waren.

Kurz vor dieser Untersuchung konnte WEIHE (1984) im Jahre 1983 aufgrund der Erkrankung eines Hundes und der Uebertragung der Leptospirose auf einen Tierpfleger deutliche Indizien für die Präsenz der Serogruppe Icterohaemorrhagiae feststellen. Der kulturelle Nachweis des Erregers und damit seine definitive Identifikation fehlten. Wegen der Ratte als Erregerreservoir der Serogruppe Icterohaemorrhagiae muss jederzeit mit einer solchen Infektion gerechnet werden.

Obwohl Antikörper gegen die Serogruppe Grippotyphosa am häufigsten nachgewiesen werden konnten, wurde der entsprechende Erreger nicht isoliert. Dieser Tatsache liegt möglicherweise eine von SEBEK et al. (1982) beschriebene Eigenart von Infektionen mit diesem Typ beim Hund zu Grunde. Sie berichteten von einer langdauernden Titerpersistenz gegenüber *L. grippotyphosa* und sagten, dass die Leptospirurie bei diesem Serotyp wesentlich verkürzt sei. Bei Infektionsversuchen an drei Welpen mit *L. grippotyphosa* konnten sie in allen Fällen diesen Leptospirentyp wohl aus dem Blut, jedoch trotz mehrfacher Versuche nicht aus dem Harn reisolieren.

Nicht alle Ausscheider von Leptospiren konnten serologisch erfasst werden. Durch die serologische Untersuchung wären nur gerade bei 3 der 7 Leptospirenträger die Infektion und die Serogruppe entdeckt worden. Dies bestätigt die Feststellungen von DOLOWY und REICH (1959) und von MENGES et al. (1966). In 2 Fällen wies das serologische Resultat sogar auf eine andere Serogruppe hin. Die Feststellung von

THIERMANN (1984), dass eine serologische Untersuchung allein die Leptospiroseprävalenz nicht richtig widerspiegeln könne, ist durch die eigene Untersuchung bestätigt worden.

4.4. Methodische Aspekte im Zusammenhang mit dem Nachweis der Leptospirose

4.4.1. Vorbehandlung der Hunde, pH-Wert, Osmolalität und Dichte der Harnproben

THIERMANN (1980) berichtet über 4 Versuche zur Alkalisierung des Hundeharnes. Er beobachtete nach peroraler Vorbehandlung mit 7 g Bikarbonat auf 25 bis 40 kg Körpergewicht (entspricht einer Dosierung von 175 bis 280 mg pro kg Körpergewicht) einen Anstieg von 1,5 bis 3 pH-Einheiten und pH-Werte von 8,0 bis 9,0. Wegen fehlender Angaben über die genaue Zeitdauer zwischen Vorbehandlung und Harnprobenentnahmen und wegen individueller Faktoren wie Stoffwechsellaage, Magenfüllung und Miktionsverhalten, welche den pH-Wert beeinflussen können, sind diese Werte nur approximativ mit den eigenen Untersuchungsergebnissen vergleichbar. Obwohl die Bikarbonatgaben in der eigenen Untersuchung im Mittel mehr als doppelt so hoch waren wie jene des genannten Autors, betrug der höchste gemessene pH-Wert nur 8,41. Die durchschnittlichen pH-Werte lagen aber weit unter 8,0 und der pH-Anstieg war weit geringer.

Die Furosemiddosis wurde, weil keine Angaben im Zusammenhang mit Leptospirennachweisen bei Hunden vorlagen, auf 5 mg pro kg Körpergewicht festgelegt. Diese Dosis bewirkt nach den Angaben von BECKER et al. (1967) etwa eine 2 1/2 bis 3-fache Zunahme der Harnmenge im Verlauf von 4 Stunden und erreicht etwa die Hälfte der maximal möglichen Wirkung dieses Diuretikums. Die von den Autoren beschriebene Hypo- und Isotonie von Hundeharn nach Gabe von Furosemid wurde in der eigenen Untersuchung nur bei einem Teil der Hunde beobachtet. Vermutlich waren der nach der Vorbehandlung zurückbleibende Restharn und die tiefere Dosierung des Diuretikums für die mehrheitlich hypertonen Harnproben verantwortlich. NERVIG und GARRETT (1979) stellten nach intravenöser Gabe von 0,5 mg Furosemid pro kg Körpergewicht bei Käl-

bern im Durchschnitt 22 Minuten nach der Applikation einen Abfall der Osmolarität von 725 auf 288 mOsm/l fest. Die in der eigenen Untersuchung erfassten Mittelwerte und Streuungen lagen etwas höher. Der nach Furosemidgabe anfänglich beobachtete Abfall (Tabelle 14) und darauffolgende langsame Anstieg der Osmolalität (Abbildung 3) weist auf eine langandauernde Verdünnung des Blasenurns hin, welche die von BECKER et al. (1967) beschriebene Wirkungsduer von Furosemid überschreitet.

Nach den obengenannten Autoren und nach FRIMMER (1977) bewirkt Furosemid eine im Vergleich zu Natrium und Kalium verstärkte Ausscheidung von Chlor. Dieser Effekt bewirkt eine relative Säuerung des Harnes und erklärt, weshalb die Alkalisierungswirkung des Bikarbonates im Vergleich zu den Resultaten von THIERMANN (1980) nicht so deutlich in Erscheinung trat, und weshalb bei zwei Probenpaaren ein Absinken der pH-Werte beobachtet werden konnte. Vereinzelt wurde nach der Bikarbonatgabe Speicheln, Würgen oder Erbrechen beobachtet, so dass die effektiv aufgenommene Bikarbonatmenge geringer sein konnte als die applizierte Menge. Wegen der unterschiedlichen Akzeptanz erschien eine streng dosisbezogene Auswertung in bezug auf das Bikarbonat nicht sinnvoll.

Bei nicht sehr hohen Ansprüchen an die Genauigkeit erlaubt die relativ straffe Korrelation zwischen Osmolalität und Dichte von Hundeharn, aus der instrumentell wenig anspruchsvollen und schnell durchführbaren Dichtebestimmung Rückschlüsse auf die Harnosmolalität zu ziehen.

4.4.2. Beziehung zwischen Geschlecht, Harnentnahmemethode und unspezifischem Keimgehalt der Harnprobe

OSBORNE et al. (1977) wiesen auf eine signifikante Reduktion des Bakteriengehaltes von Harnproben hin, welche nach Applikation von Furosemid gewonnen wurden. Deshalb sind bakteriologische Befunde von solchen Harnproben nur unter Vorbehalt mit normal gewonnenen Harnproben vergleichbar.

VAN DER STOCK et al. (1981) stellten deutliche geschlechtsspezifische

Unterschiede in der Häufigkeit von bakteriologisch positiven Harnproben fest. Sie fanden bei Hündinnen etwa dreimal mehr Harnproben mit signifikantem Keimgehalt (Keimzahl $\geq 0,5 \cdot 10^5/\text{ml}$) als bei Rüden. Auch in der eigenen Untersuchung wurde ein gleichsinniger, geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt.

OSBORNE et al. (1977) vermerkten, dass Harnproben, welche mit Katheter gewonnen werden, durch Bakterien in der Urethra und in der Vagina kontaminiert werden können. Sie empfahlen deshalb die Harnentnahme durch Cystocentese. Auch im eigenen Material waren bei den mit Katheter von Hündinnen entnommenen Proben leichte Kontaminationen ungleich häufiger als nach Cystocentese. Bei mittlerem bis hohem Keimgehalt bestand dieser Unterschied nicht. Der Grund kann darin liegen, dass hier echte Infektionen der Harnwege vorlagen.

4.4.3. Einfluss der Harneigenschaften auf die Isolierung von Leptospiren

4.4.3.1. Kontrollkulturen

Die Kontrollkulturen hatten den Zweck, nachweisteknische Probleme, welche durch Harneigenschaften oder durch Mängel in der Technik des kulturellen Nachweises bedingt waren, soweit als möglich offenzulegen.

Die Harnproben, bei welchen die Kontrollkulturen kein Wachstum zeigten, hatten in der Mehrzahl der Fälle pH-Werte und/oder Osmolalitätswerte, die im Vergleich zu den positiven Kontrollkulturen stark erhöht waren. Diese starke Häufung der negativen Kontrollkulturen von Harnproben im pH-Bereich über 7,90 oder im Osmolalitätsbereich über 800 mOsm/kg steht in guter Übereinstimmung mit den Resultaten von NERVIG und GARRETT (1979), denen es nicht gelang, Leptospiren aus Kälberharn mit einer Osmolarität über 615 mOsm/l nachzuweisen und mit den Resultaten von THIERMANN (1980), welchem kein kultureller Leptospirennachweis aus Hundeharnproben mit einem pH-Wert über 8,0 gelang.

In der eigenen Untersuchung lagen bis auf 2 Fälle deutliche Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen den Harneigenschaften und dem

fehlenden Wachstum von Kontrollkulturen vor. In einem dieser negativen Fälle könnte die Hemmung der Kontrollkultur des unverdünnten Harnes durch agglutinierende Antikörper, welche von VAN DER HOEDEN (1936) und von STUART (1956) im Harn von blutserologisch positiven Hunden beobachtet worden waren, zustandegekommen sein. Der entsprechende Hund hatte im Blut Agglutinine gegen den in die Kontrollkultur verimpften Laborstamm; im übrigen waren die Harnproben und die Kulturen unauffällig und die Kontrollkultur aus 100-fach verdünntem Harn verlief positiv. Im andern Fall war die Hemmung wahrscheinlich nicht auf die Beschaffenheit der Harnprobe, sondern auf eine technisch bedingte Kontamination zurückzuführen.

4.4.3.2. Isolierung von Leptospiren

Im Gegensatz zur Untersuchung von THIERMANN (1980), welcher ohne Furosemid arbeitete, konnten in der eigenen Untersuchung kulturelle Leptospirennachweise aus Hundeharnproben, bei denen der pH-Wert ausserhalb des Bereichs von 6,6 bis 8,0 lag, erbracht werden. Die Versuche von BROUGHTON und SCARNELL (1985) ergaben, dass eine Furosemidbehandlung allein, d.h. ohne eine zusätzliche Anpassung des Harn-pH-Wertes genügt, um Leptospiren mit einer hohen Erfolgsquote kulturell im Hundeharn nachzuweisen. Diese Tatsachen sind ein Hinweis darauf, dass die Säure-Base-Empfindlichkeit von Leptospiren mit abnehmender Harndichte geringer wird. In vitro Untersuchungen von KAISER und DOETSCH (1976) mit nach pH-Wert und Molarität definierten Lösungen und in vitro Untersuchungen von NERVIG und GARRETT (1979) mit nach pH-Wert und Osmolarität definiertem Harn bestätigen dieses Phänomen.

In der eigenen Untersuchung gelangen Leptospirenisolierungen trotz unspezifischem Keimgehalt in der Harnprobe und auch trotz Kontamination der beimpften Kulturmedien. Mit zunehmender Verdünnung des Harnes nahm der Anteil der positiven Kulturen ab. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten der Kontrollkulturen. Bei einem Teil der Proben gelang aber der kulturelle Leptospirennachweis erst nach der Verdünnung des Harnes, das heisst nach einer Abschwächung wachstumshemmender Faktoren. Die entsprechenden Harnproben waren zusätzlich mit anderen Bakterien kontaminiert oder lagen in bezug auf den pH-Wert

oder die Osmolalität in einem als kritisch beurteilten Grenzbereich. Offensichtlich bestehen wegen der relativ geringen Leptospirendichte im Harn sehr enge Grenzen in bezug auf die Verdünnungsmöglichkeiten. Die Untersuchungen von BROUGHTON und SCARNELL (1985) bestätigen, dass mit zunehmender Reduktion der Harnmenge die Häufigkeit positiver Leptospirenkulturen aus Hundeharn deutlich abnimmt, und dass kontaminationsbedingte Ausfälle bei Kulturen mit grosser Harnmenge häufiger sind.

Neben einer Verbesserung der Nährmedien kann möglicherweise durch eine Vergrösserung der Inokulat- und Kulturmedienvolumina und eine verfeinerte Abstufung der Verdünnungsreihe die kulturelle Nachweisbarkeit von Leptospiren aus Harnproben mit kritischer Leptospirendichte oder kritischen Harnparametern verbessert werden, weil dadurch die absolute Zahl der Leptospiren in den Inokulaten vergrössert werden kann. Ebenso würden mehrfache Kulturansätze aus der gleichen Harnprobe den kritischen Bereich in bezug auf die Leptospirendichte stärker ausschöpfen, und es würde die Kontaminationsgefahr durch Harnwegsinfektionen, durch Schwierigkeiten bei den Probenentnahmen oder durch Mängel in der Technik des kulturellen Nachweises verringert. Durch die Verdoppelung der Kulturansätze aus Hundeharnproben konnten BROUGHTON und SCARNELL (1985) die Ausbeute an positiven kulturellen Leptospiruriebefunden im Vergleich zu einfach angesetzten Kulturserien gesamthaft um etwa 10 % verbessern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Ermittlung der Prävalenz von Leptospireninfektionen in der schweizerischen Hundepopulation wurden am Biologischen Zentrallaboratorium des Universitätsspitals Zürich im Verlaufe eines Jahres von 192 frisch akquirierten Hunden Blut- und Harnproben entnommen. Die Blutproben wurden mittels mikroskopischem Agglutinationstest (MAT) auf Antikörper untersucht. 26,6% der Hunde wiesen Antikörpertiter zwischen 1:100 und 1:3200 gegen Leptospiren auf. Am häufigsten wurden Antikörper gegen die Serogruppe Grippotyphosa (15,1%), in geringerem Masse gegen Australis (6,8%) und Icterohaemorrhagiae (6,3%) und vereinzelt gegen Canicola und Sejroe (je 1,0%) festgestellt. Die Harnentnahme erfolgte nach einer harnalkalisierenden und diuretischen Behandlung der Hunde. Die Proben wurden kulturell (EMJH-Medium) sowie dunkelfeldmikroskopisch und zum Teil fluoreszenzserologisch untersucht. Die dunkelfeldmikroskopischen und fluoreszenzserologischen Untersuchungen ergaben keine positiven Leptospirenbefunde. Bei 4 Hunden konnte *Leptospira lora* (Serogruppe Australis), bei 2 Hunden *Leptospira saxkoebing* (Serogruppe Sejroe) und bei 1 Hund *Leptospira hardjo* (Serogruppe Sejroe) isoliert werden. Bei den Hunden mit Leptospirurie bestanden keine Hinweise auf eine klinische Erkrankung. 2 Leptospirenisolate stammten von serologisch negativen Hunden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackermann, O., Stegmann, H. und Jaeger, O. (1983b): Gleichzeitige Immunisierung von Hunden gegen Parvovirose, Staupe, Tollwut, H.c.c. und Leptospirose; Die Blauen Hefte 67, 302-308
- Ackermann, O., Tiefenbach, B. Jaeger, O. und Daerr, H.C. (1983a): Kombinierte Immunisierung von Hunden gegen Parvovirose, Tollwut, H.c.c. und Leptospirose; Die Blauen Hefte 66, 255-262
- Alexander, A.D., Gleiser, C.A., Malnati, P. and Yoder, H. (1957): Observations on the prevalence of leptospirosis in canine populations of the United States; Amer. J. Hyg. 65, 43-56
- Becker, W., Zuschek, F. and Smith, G.B. (1967): Report on a new diuretic-saluretic agent - furosemide; Veterinary Medicine / Small Animal Clinician 62, 760-764
- Bey, R.F. and Johnson, R.C. (1982): Leptospiral vaccines in dogs: Immunogenicity of whole cell and outer envelope vaccines prepared in protein-free medium; Amer. J. Vet. Res. 43, 831-834
- Brem, S. und Weber, A. (1984): Zur Sensitivität und Spezifität eines im Handel erhältlichen Objektträgeragglutinationstestes für den Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren in Serumproben von Hunden; Kleintierpraxis 29, 199-202
- Brieger, C. und Brack, A. (1985): *Leptospira interrogans* serovar hardjo beim Rind: Prävalenz und Bedeutung als Aborterreger in der Schweiz; Vet.-Med. Diss., Zürich
- Broughton, E.S. and Scarnell, J. (1985): Prevention of renal carriage of leptospirosis in dogs by vaccination; Vet. Rec. 307, 307-311
- Brunner, K.T., Scheitlin, M. und Stünzi, H. (1951): Zum serologischen Nachweis der Hepatitis contagiosa canis. Zugleich Untersuchungen über die Frequenz der Leptospirosen beim Hund; Schweiz. Arch. Tierheilk. 43, 452-458
- Carter, J.M., Klausner, J.S., Osborne, C.A. and Bates, F.Y. (1978): Comparison of collection techniques for quantitative urine culture in dogs; J. Amer. Vet. Med. Ass. 173, 294-298
- Chang, S.L., Buckingham, M. and Taylor, M.P. (1948): Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*. IV. Survival in water and sewage: Destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat; J. Infect. Dis. 82, 256-266
- Chernukha, Y.G. and Karaseva, E.V. (1965): *Leptospira* infection of serotype lora (australis group) found in the U.S.S.R.; Trop. Geogr. Med. 17, 22-25
- Clegg, F.G. and Heath, P.J. (1975): Subclinical *L.icterohaemorrhagiae* infection in dogs associated with a case of human leptospirosis; Vet. Rec. 96, 385

Cole, J.R., Sulzer, C.R. and Pursell, A.R. (1973): Laboratory diagnosis of leptospirosis in domestic animals; Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Ass. 83, 189-199

Dolowy, W.C. and Reich, C.V. (1959): Serological survey of 659 dogs for leptospirosis using the capillary tube method; J. Amer. Vet. Med. Ass. 35, 486-487

Dröge, P. und Vick, K.-P. (1977): Ein Beitrag zur Hundeleptospirose-Statistik in den Jahren 1974/1975; Kleintierpraxis 22, 35-38

Dürr, U.M. und Kraft, W. (1975): Kompendium der klinischen Laboratoriumsdiagnostik bei Hund, Katze, Pferd; Verlag M. u. H. Schaper, Hannover

Ellinghausen, H. C. (1973): Growth temperatures, virulence, survival and nutrition of leptospires; J. Med. Microbiol. 6, 487-497

Ellinghausen, H.C. and McCullough, W.G. (1965): Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of other 13 serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbat 80; Amer. J. Vet. Res. 26, 45-51

Faine, S. (1983): Is leptospirosis a "rare" disease?; Med. J. Aust. 70/1, 445-446

Feigin, R.D., Lobes, L.A., Anderson, D. and Pickering, L. (1973): Human leptospirosis from immunized dogs; Ann. Intern. Med. 79, 777-785

Fraser, D.W., Glosser, J.W., Francis, D.P., Phillips, C.J., Feeley, J.C. and Sulzer, C.R. (1973): Leptospirosis by serotype fort-bragg. A suburban outbreak ; Ann. Intern. Med. 79, 786-789

Freudiger, U. (1955): Zur Leptospirose des Hundes. Epidemiologie, Serologie, pathologische Anatomie, Klinik und Pathogenese; Habilitationsschrift, Bern

Frimmer, M. (1977): Pharmakologie und Toxikologie; 2. Auflage, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart

Ganong, W.F. (1972): Medizinische Physiologie. Kurzgefasstes Lehrbuch der Physiologie des Menschen für Studierende der Medizin und Aerzte; 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

Gans, J.H. and Mercer, P.F. (1977): The kidneys. In: Swenson, M.J. (ed.): Dukes' Physiology of Domestic Animals; 9th Edition, Cornell University Press, London, pp 463-492

Greene, C.E. (1984): Leptospirosis. In: Greene, C.E. (ed.): Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat; W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 588-598

Gsell, O. (1952): Leptospirosen. Klinik und Epidemiologie von Weilscher Krankheit, Feld-, Ernte- und Sumpffieber, Schweinehüterkrankheit, Canicolfieber, Reisfeldfieber und andern Leptospiireninfektionen bei Mensch und Tier; Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern

Gsell, O. und Kanter, U. (1945): Canicola-Fieber in der Schweiz (Menschliche Infektion mit *Leptospira canicola* bei Stuttgarter Hundeseuche); Schweiz. Med. Wschr. 75, 713-719

- Hartman, E.G., Brummelman, B. and Dikken, H. (1975): *Leptospirae* of serotype lora of the serogroup australis isolated for the first time from swine in the Netherlands; T. Diergeneesk., 100, 421-425
- Horsch, F. und Kutschmann, K. (1974): Die Leptospirosesituation bei Hunden in der DDR; Mh. Vet. Med. 21, 241-243
- Hubbert, W.T. and Shotts, E.B. (1966): Leptospirosis in kennel dogs; J. Amer. Vet. Med. Ass. 148, 1152-1159
- Hübner, D. (1972): Beitrag zum Stand der Leptospirenverseuchung von Hunden; Fortschr. Vet. Med. (Beihefte zum Zbl. Vet. Med.) 17, 87-93
- Huhn, R.G., Baldwin, C.D. and Cardella, M.A. (1975): Immunity to leptospirosis: Bacterins in dogs and hamsters; Amer. J. Vet. Res. 36, 71-74
- Jaksch, W. und Glawischnig, E. (1976): Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haustiere; Verlag Paul Parey, Berlin
- Jaksch, W., Stettner, W., Willinger, H. und Awad-Masalmeh, M. (1976): Klinische und serologische Untersuchungen zur Leptospirose des Hundes im Raum Wien; Der praktische Tierarzt 57, 282-285
- Jenny, J. und Kanter, U. (1946): Ueber Leptospirosen. Ein Seuchenzug von Stuttgarter Hundeseuche in Zürich 1944/45; Schweiz. Arch. Tierheilk. 88, 161-181
- Johnson, R.C. and Harris, V.G. (1967): Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires; J. Bacteriol. 94, 27-31
- Johnson, R.C. and Rogers, P. (1964): 5-fluorouracil as a selective agent for growth of leptospires; J. Bacteriol. 87, 422-426
- Kaiser, G.E. and Doetsch, R.N. (1976): The effects of alkalinity and hypertonicity on the morphology and motility of *Leptospira interrogans* (biflexa) strain B 16; J. Gen. Microbiol. 96, 25-33
- Kathe, J. (1967): Historische Entwicklung der Leptospirenforschung. In: Kathe, J. und Mochmann, H. (Hrsg.): Leptospiren und Leptospirosen; Verlag VEB Gustav Fischer, Jena, pp 3-17
- Kerr, D.D. and Marshall, V. (1974): Protection against the renal carrier state by a canine leptospirosis vaccine; Veterinary Medicine / Small Animal Clinician 69, 1157-1160
- Ketz, H.-A. (1974): Die Physiologie der Niere. In: Kolb, E. (Hrsg.): Lehrbuch der Physiologie der Haustiere; 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp 619-652
- Kirk, R.W. and Bistner, S.I. (1981): Handbook of Veterinary Procedures and Emergency Treatment; 3rd Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia
- Kirschner, L. and Maguire, T. (1957): Survival of *Leptospira* outside their hosts; N.Z. Med. J. 56, 385-391
- Leptospirosis Reference Laboratory (1983): Leptospirosis in man, British isles, 1982; Brit. Med. J. 287, 1365-1366

Low, D.G., Hiatt, C.W., Gleiser, C.A. and Bergman, E.N. (1956): Experimental canine leptospirosis. I. *Leptospira icterohaemorrhagiae* infections in immature dogs; J. Infect. Dis. 98, 249-259

Lübbers, P. (1951): Ueber das Vorkommen der *Leptospira saxkoebing* in Schleswig-Holstein; Z. Hyg. 132, 347-351

Lukes, J. (1923): Spirochäten als Erreger der Stuttgarter Hundeseuche; Dtsch. tierärztl. Wschr. 31, 137-138

Marshall, V. (1983): Efficacy of *Leptospira* vaccine; J. Amer. Vet. Med. Ass. 183, 12 und 34

McIntyre, W.I.M. and Seiler, H.E. (1953): Epidemiology of canicola-fever; J. Hyg. (Camb.) 51, 330-339

Menges, R.W., Galton, M.M. and Habermann, R.T. (1960): Culture and serologic studies on four dogs inoculated with two leptospiral serotypes, *Leptospira pomona* and *Leptospira canicola*; Amer. J. Vet. Res. 21, 371-376

Nervig, R.M. and Garrett, L.A. (1979): Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation; Amer. J. Vet. Res. 40, 1197-1200

Okazaki, W. and Ringen, L.M. (1957): Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*; Amer. J. Vet. Res. 18, 219-223

Osborne, C.A., Johnston, G.R. and Schenk, M.P. (1977): Cystocentesis: Indications, contraindications, technique and complications; Minn. Vet. 17, 9-10 und 12-14

Popp, L. (1967): Laboratoriumsdiagnostik der Leptospiren. In: Kathe, J. und Mochmann, H. (Hrsg.): Leptospiren und Leptospirosen; Verlag VEB Gustav Fischer, Jena, pp 249-287

Sebek, Z., Sixl, W. und Caspaar, V. (1982): Experimentelle Infektion des Hundes mit *Leptospira grippotyphosa*; Wien. tierärztl. Mschr. 69, 78-81

Sebek, Z. und Wurst, Z. (1975): Zur Dynamik der Leptospiren-Antikörper bei spontan infizierten Hunden; Mh. Vet. Med. 30, 266-269

Sikora, P.J. (1983): Zoonotic aspects of using leptospira bacterin; J. Amer. Vet. Med. Ass. 183, 346

Stoenner, H.G. (1976): Treatment and control of leptospirosis. In: Johnson, R.C. (ed.): The Biology of Parasitic Spirochetes; Academic Press, New York, pp 375-388

Stuart, R.D. (1956): The importance of urinary antibodies in the diagnosis of leptospirosis; Canad. J. Microbiol. 2, 288-297

Thiermann, A.B. (1980): Canine leptospirosis in Detroit; Amer. J. Vet. Res. 41, 1659-1661

Thiermann, A.B. (1983): Leptospirosis immunization; J. Amer. Vet. Med. Ass. 183, 838-839

Thiermann, A.B. (1984a): Leptospirosis: Current developments and trends; J. Amer. Vet. Med. Ass. 184, 722-725

Thiermann, A.B. (1984b): Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis; *Mod. Vet. Pract.* 65, 758-759

Torten, M. (1979): Leptospirosis. In: Steele, J.H. (ed.): CRC-Handbook Series in Zoonoses; Vol. 1, CRC Press, Inc., Boca Raton, pp 365-420

Turner, L.H. (1970): Leptospirosis III: Maintenance, isolation and demonstration of leptospire; *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* 64, 623-646

Unglaub, W. und Rischer, U. (1974): Eine Statistik der Hundeleptospirose-serologie (1970-1973); *Kleintierpraxis* 19, 252-255

Van der Hoeden, M.J. (1936): Anticorps specifiqués de la maladie de Weil dans l'urine; *Ann. Inst. Pasteur* 56, 206-220

Van der Stock, J., de Schepper, J. and Devriese, L.A. (1981): Bacteriuria in the dog: A report of sixty cases; *Vlaams Diergeneesk. T.* 50, 109-117

Weihe, W.H. (1984): Ein Fall von akuter Leptospirose von Hund und Mensch in einer Versuchstierhaltung; *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 91, 227-230

Weil, A. (1886): Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectiouskrankheit; *Dtsch. Arch. klin. Med.* 39, 209-232

World Health Organization (1972): Memoranda: Research needs in leptospirosis; *Bull. WHO* 47, 113-122

Zwierzchowski, J. (1967): Klinik und Therapie der Leptospirosen der Haus- und Nutztiere. In: Kathe, J. und Mochmann, H. (Hrsg.): Leptospiren und Leptospirosen; Verlag VEB Gustav Fischer, Jena, pp 79-150

Verdankungen

Ich danke allen, die in irgendeiner Form bei der Entstehung der Arbeit mitgewirkt haben.

Im besonderen danke ich:

Herrn Prof. Dr. H. U. Bertschinger für die Ueberlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit,

Herrn Dr. L. Corboz für die sachkundige Leitung der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. P. E. Thomann für die Uebernahme des Korreferates,

Herrn Dr. W. H. Weihe, Leiter des Biologischen Zentrallaboratoriums, Universitätsspital Zürich, für die Anregung, die Hunde des Zentral-laboratoriums für diese Untersuchung zu verwenden sowie für die grosszügige Ueberlassung der Infrastruktur seines Laboratoriums,

Herrn und Frau Drs. Brack-Brieger für aufmunternde Unterstützung,

allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich, insbesondere Frau I. Jakober für die Herstellung der Nährmedien,

den Tierpflegern des Biologischen Zentrallaboratoriums des Universitätsspital Zürich, insbesondere Frau R. Katumba, Herrn M. Grille und Herrn V. Videla für die Mithilfe bei der Untersuchung der Hunde,

Herrn PD Dr. H. Lutz, Veterinärmedizinische Klinik der Universität Zürich, für die spontane Unterstützung bei den osmometrischen Bestimmungen,

Herrn Dr. W. J. Terpstra, WHO Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Amsterdam, für die Typisierung der Leptospirenisolates,

und Frau E. Bivetti-Emmenegger für die liebenswürdige Mithilfe bei der Reinschrift des Manuskriptes.

Lebenslauf

28. August 1947	geboren in Zürich
1954 - 1961	Primarschule in Zürich
1961 - 1964	Sekundarschule in Zürich
1964 - 1970	Anstellungen als Hilfskraft und Vorbereitung auf die Maturitätsprüfung am Gym- nasium Juventus, Zürich
1970	Maturität Typus B, ausgestellt von der eidge- nössischen Maturitätskommission in Basel
1970 - 1973	Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
1973 - 1975	Studium der Pädagogik an der Universität Zürich (abgebrochen)
1975 - 1979	Fortsetzung des Studiums der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
1979	Eidgenössische Fachprüfung für Tierärzte
1979 - 1980	Praktika bei Tierärzten
1980 - 1981	Assistent am Institut für Zuchthygiene der Universität Zürich
1981 - 1983	Assistent an einer privaten Kleintierklinik
1983 - 1986	Arbeit an der Dissertation am Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich, Vertretungen in Kleintierpraxen

